

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1972 - N°

67

**DOSAGE DE LA QUINIDINE
DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES
ET ÉTUDE DE SON MÉTABOLISME
CHEZ LE CHIEN**

Travail du Laboratoire de Chimie Analytique (Pr BADINAND),
du Laboratoire de Pharmacologie Médicale (Pr FAUCON)
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

et du Laboratoire de la Pharmacie (Pr BADINAND)
HOPITAL ÉDOUARD-HERRIOT

LYON

THÈSE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON

Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

et soutenue publiquement le 11 Avril 1972
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

par

Jacques ARMAND

né le 3 Août 1942

à SAINT-PRIEST (Rhône)

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1971 - 1972

DOSSAGE DE LA QUINIDINE
DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES
ET ETUDE DE SON MÉTABOLISME
CHEZ LE CHIEN

Travail du Laboratoire de Chimie Analytique (Pr. GADREAU)
du Laboratoire de Pharmacologie Médicale (Pr. FAUCON)
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
et de l'Université de la Pharmacie (Pr. GADREAU)
MONTAIGNE-BOULEVARD

LYON

THÈSE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON I

Unité d'Enseignement et de Recherche

des Sciences Pharmaceutiques

et soutenue publiquement le 27 mai 1972

pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

par

Jacques ARMAND

né le 3 Août 1942

7, rue de la République (69001)

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1972 - N°

**DOSAGE DE LA QUINIDINE
DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES
ET ÉTUDE DE SON MÉTABOLISME
CHEZ LE CHIEN**

Travail du Laboratoire de Chimie Analytique (Pr BADINAND),
du Laboratoire de Pharmacologie Médicale (Pr FAUCON)
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

et du Laboratoire de la Pharmacie (Pr BADINAND)
HOPITAL ÉDOUARD-HERRIOT

LYON

THÈSE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON

Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

et soutenue publiquement le 11 Avril 1972
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

par

Jacques ARMAND

né le 3 Août 1942

à SAINT-PRIEST (Rhône)

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1972 - 73

DOSAGE DE LA QUINIDINE
DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES
ET ÉTUDE DE SON MÉTABOLISME
CHEZ LE CHIEN

Travail du Laboratoire de Chimie Analytique (Dr. BARDY),
du Laboratoire de Pharmacologie Clinique (Dr. FALCOT),
Faculté de Médecine et de Pharmacie
et du Laboratoire de la Pharmacologie (Dr. BARDY),
HÔPITAL BOYER-RENELOT

LYON



Le présent travail a été réalisé
dans l'Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques
et soutenu publiquement le 11 Avril 1973
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

par

Jacques ARMAND

né le 3 Août 1945

à SAINT-PIERRE (France)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON

Président : Monsieur le Professeur J. BOIDIN

1er Vice-Président : M.R. TOURAINE, Maître de Conférences agrégé

2ème Vice-Président : M.P. PONCET, Maître-Assistant

3ème Vice-Président : M.D. SETTELEN, Etudiant

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

UNITES

DIRECTEURS

U.E.R. médicale Grange-Blanche

M. le Professeur D. GERMAIN

U.E.R. médicale Alexis-Carrel

M. le Professeur C. GIROD

U.E.R. médicale Lyon-Nord

M. le Professeur A. BERTOYE

U.E.R. médicale Lyon Sud-Ouest

M. le Professeur L. TOLOT

U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques

M. M. CARRAZ Maître de Conférences-Agrégé

U.E.R. des Techniques de Réadaptation

M. le Professeur P. MOUNIER-KUHN

U.E.R. de Biologie Humaine

M. J.C. CZYBA Maître de Conférences-Agrégé

Institut Régional d'Education Physique
et Sportive

M. J. SAPIN, Professeur E.P.S.

U.E.R. de Mathématiques

M. le Doyen J. BRACONNIER

U.E.R. de Physique

M. le Professeur M. DUFAY

U.E.R. de Chimie et Biochimie

M. le Professeur D. GAUTHERON

U.E.R. des Sciences de la Nature

M. le Professeur L. DAVID

U.E.R. de Biodynamique et Psychopédagogie

M. le Professeur J. CHANEL

U.E.R. de Physique nucléaire

M. le Professeur A. SARAZIN

Institut Universitaire de Technologie I

M. le Professeur L. FEUVRAIS

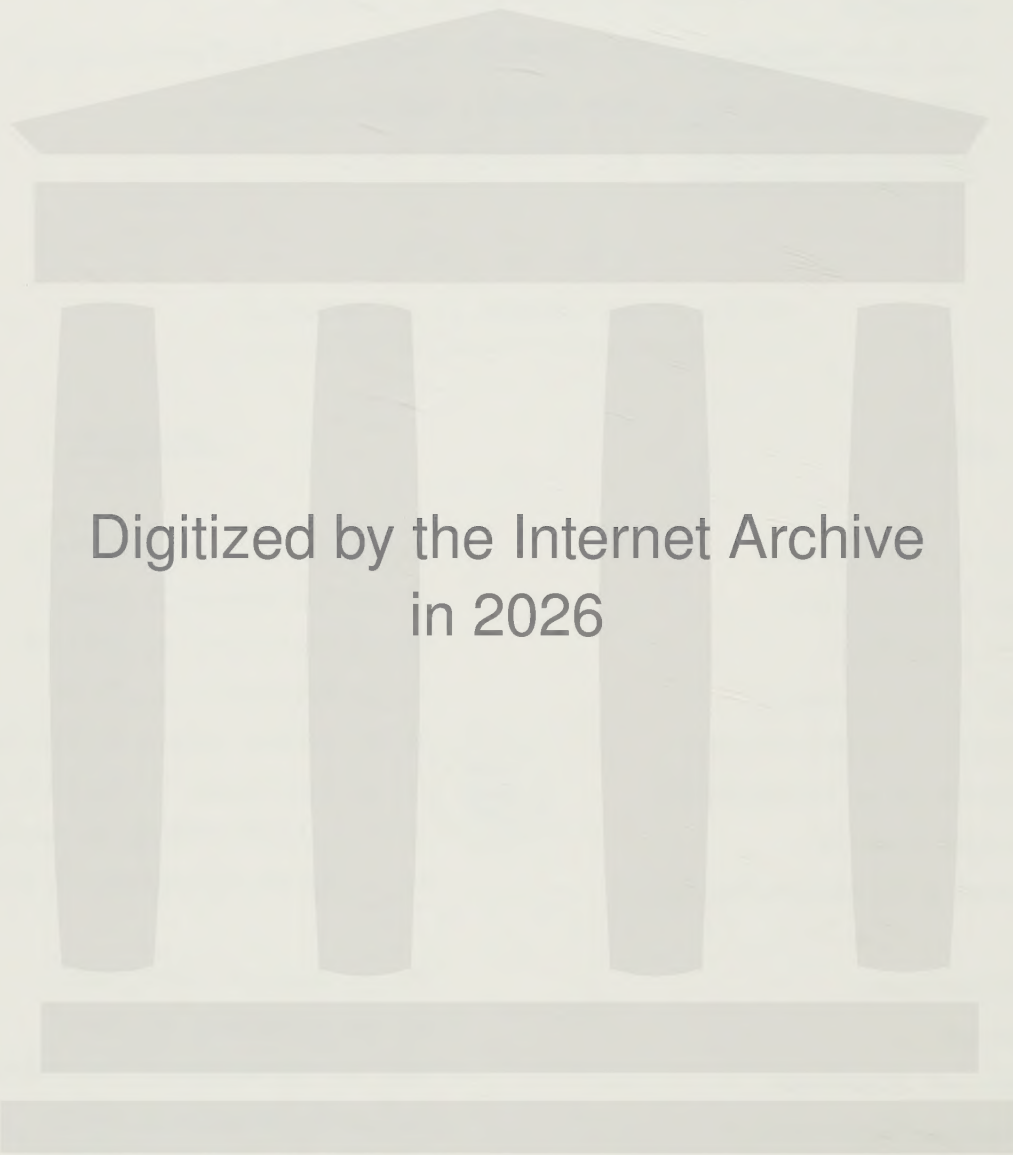
Institut Universitaire de Technologie II

M. J. GALLET

Observatoire

M. le Professeur J.H. BIGAY

Secrétaire Général : M.P. IZAUTE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552607_0002

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur A. BADINAND

Nous lui sommes très reconnaissant de la confiance qu'il nous a accordée en faisant de nous son collaborateur, à la Faculté et à l'Hôpital. Nous voudrions lui dire combien cette collaboration quotidienne nous est riche d'enseignements et combien il est plaisant de travailler à ses côtés.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre gratitude et de notre attachement.

A NOS MAITRES ET JUGES

Monsieur le Professeur . G. FAUCON

Une part de ce travail a été réalisée dans son Laboratoire et a bénéficié de sa compétence et de ses précieux conseils. Nous lui sommes également reconnaissant de bien vouloir diriger notre travail de Biologie Humaine.

-Qu'il soit assuré de notre reconnaissance et de notre dévouement.

Monsieur le Professeur A. CIER

Au cours de nos études, nous avons apprécié la clarté et la rigueur de son enseignement. En acceptant d'être notre juge, il nous apporte la garantie de sa compétence.

Nous espérons qu'il jugera ce travail avec bienveillance et l'assurons de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Agrégé J. COTTE

Il sait que nous lui devons beaucoup. Il a, en nous préparant avec enthousiasme au concours de l'Internat, donné une certaine orientation à notre carrière. A ce titre, il est assuré de notre reconnaissance et de notre vive gratitude. Nous le remercions d'être parmi nos juges.

A Monsieur le Professeur Agrégé J.J. VALLON

Au cours de ce travail, nous n'avons jamais fait appel en vain à ses talents d'analyste et nous lui sommes reconnaissant des conseils avisés qu'il nous a toujours donnés.

Qu'il soit assuré de notre amitié.

A TOUS CEUX QUI NOUS ONT AIDE DANS LA REALISATION DE CE TRAVAIL

J. Cl. EVREUX et R. BAZAUGOUR

A NOTRE MAITRE DE STAGE

Monsieur L. MAGNET

qui a su nous faire partager l'amour de son métier.

A NOS MAITRES DE LA FACULTE ET DES HOPITAUX DE LYON

A NOS AMIS DU LABORATOIRE DE CHIMIE ANALYTIQUE ET DU LABORATOIRE DE LA
PHARMACIE DE L'HOPITAL EDOUARD HERRIOT

A NOS AMIS DE L'INTERNAT EN PHARMACIE

DOSAGE DE LA QUINIDINE DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES

ET ETUDE DE SON METABOLISME CHEZ LE CHIEN

Travail du Laboratoire de Chimie Analytique (Pr BADINAND), du Laboratoire de Pharmacologie Médicale (Pr FAUCON) - Faculté de Médecine et de Pharmacie - et du Laboratoire de la Pharmacie (Pr BADINAND) - Hôpital Edouard Herriot -

L Y O N

INTRODUCTION

C'est DE SENAC (1) qui reconnut le premier l'action cardiaque du quinquina. Il écrivait, en 1749, dans un traité portant sur le coeur et ses maladies : " De tous les remèdes stomachiques, celui dont les effets m'ont paru les plus constants et les plus prompts en beaucoup de cas, c'est le quinquina, mêlé avec un peu de rhubarbe. Des palpitations longues et rebelles ont cédé à ce fébrifuge, secondé d'un léger purgatif " .

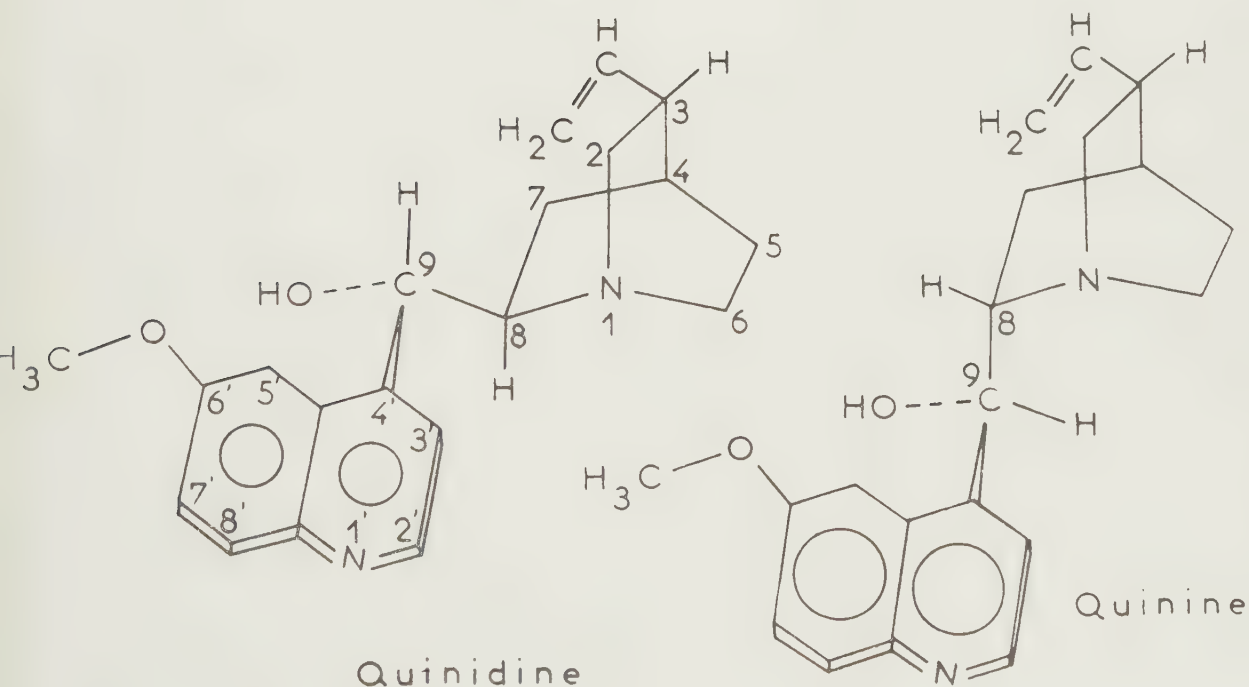
Cette action cardiaque est due à deux alcaloïdes isomères : l'un, la quinine, découvert en 1821 par PELLETIER et CAVENTOU, l'autre, la quinidine, découvert par HENRY et DELONDRE en 1833. Mais il fallut attendre 1918 pour que FREY (2) montrât que la quinidine était un antifibrillant plus puissant que la quinine. Cependant, à côté de son efficacité, les inconvénients et les risques parfois mortels du traitement apparurent très rapidement. Malgré ceci, la quinidine fut largement utilisée dans la réduction des troubles du rythme cardiaque.

Depuis ces dix dernières années, la technique de régularisation par choc électrique externe (cardioversion), mise au point par LOWN, a réduit très sensiblement l'usage de la quinidine. " Mais, comme le souligne LENEGRE (3), le traitement de la fibrillation auriculaire par la quinidine n'est pas totalement condamné. Il faut le réserver à un petit nombre de cas de fibrillations auriculaires sévères et mal tolérées, dans lesquels la cardioversion a été inefficace ou impossible, en se rappelant que la quinidine peut réussir là où le choc électrique a échoué " *.

* Pour les indications cliniques et thérapeutiques de la quinidine, on consultera avec intérêt certaines revues générales bien documentées (4-8) .

Chimiquement, la quinidine, de même que la quinine, est constituée d'un noyau quinoléique relié à un noyau quinuclidique par une fonction alcool secondaire. Le noyau quinoléique est méthoxylé en 6', tandis que le noyau quinuclidique est vinylié en 3. La cinchonine et la cinchonidine, autres alcaloïdes isomères du quinquina, présentent la même structure à l'exception du noyau quinoléique qui n'est pas substitué.

Quinidine et quinine possèdent 4 carbones asymétriques en 3, 4, 8, 9 ; mais si elles ont les mêmes configurations sur les carbones 3 et 4, elles diffèrent par la configuration sur les carbones 8 et 9, comme le montre la figure ci-dessous.



Le travail que nous présentons consiste en une étude analytique et métabolique de la quinidine. Nous aborderons successivement :

Chapitre premier	Etude analytique par chromatographie en couches minces de quelques alcaloïdes du quinquina. Pureté de la quinidine du commerce.
Chapitre second	Dosage de la quinidine dans les milieux biologiques
Chapitre troisième	Sort de la quinidine dans l'organisme Etude chez le Chien.
Chapitre quatrième	Evolution clinique et biologique d'une intoxication par la quinidine (La rareté de l'intoxication aiguë volontaire par la quinidine nous a incité à placer cette observation dans ce travail) .

Chapitre Premier

Etude Analytique par CCM

de

Quelques Alcaloïdes du Quinquina

Pureté de la Quinidine du Commerce

P L A N

1. TRAVAUX ANTERIEURS

2. TRAVAUX PERSONNELS

2.1. Essais qualitatifs

Partie expérimentale

Résultats - Discussion

2.2. Essais quantitatifs

Partie expérimentale

Résultats

3. CONCLUSION

Quand on aborde l'étude du métabolisme d'un composé, quel qu'il soit, il faut tout d'abord contrôler sa pureté, et s'il n'est pas pur, identifier et doser les produits qui le souillent. Dans ce but, nous avons soumis la quinidine *, objet de notre travail, et quelques autres alcaloïdes du quinquina, à l'analyse chromatographique.

A la chromatographie sur papier (9-15); longue et fastidieuse, nous avons préféré la chromatographie en couches minces (C.C.M.) . Celle-ci, en raison de sa réalisation facile, de son excellente sensibilité, de sa rapidité et de la finesse des séparations qu'elle permet, a été et est encore très utilisée pour l'identification des alcaloïdes - entre autres des alcaloïdes du quinquina - que ce soit dans des préparations pharmaceutiques ou dans des liquides biologiques (16-20).

1. TRAVAUX ANTERIEURS

Trois publications - celles de VAN SEVEREN (21), SUSZKO (22) et STORCK (23) - se sont très précisément attachées à la séparation des alcaloïdes du quinquina, par C.C.M. , sur gel de silice.

* Nous remercions vivement les laboratoires Nativelle qui ont mis gracieusement à notre disposition la quinidine.

VAN SEVEREN sépare complètement la quinine, la quinidine, la cinchonine et la cinchonidine par chromatographie bidimensionnelle. Les systèmes solvants sont dans la 1^{ère} dimension : cyclohexanol/cyclohexane/hexane 1/1/1 + 5 % de diéthylamine, et dans la 2^{ème} dimension : chloroforme/méthanol/diéthylamine 80/20/0,2 .

SUSZKO différencie les alcaloïdes vinylés de leurs dérivés dihydrogénés au moyen du système chloroforme/méthanol/diéthylamine 80/20/1 . Remarquons que ce système ne permet pas de séparer la dihydroquinine de la dihydroquinidine et la dihydrocinchonine de la dihydrocinchonidine.

STORCK enfin utilise le mélange chloroforme/diéthylamine 90/10 pour la séparation des principaux alcaloïdes du quinquina, à l'exception des hydrobases, et le mélange acétone/méthanol/diéthylamine 50/50/1 pour séparer les hydrobases des bases.

2. TRAVAUX PERSONNELS

2.1. Essais qualitatifs

Partie expérimentale

Parmi les supports proposés, notre choix s'est porté sur le gel de silice. 50 g de Kieselgel G (Merck n° 7731) sont agités vigoureusement avec 70 ml d'eau et 10 ml d'acétone. Ce mélange est étalé sur 5 plaques de verre de 20 x 20 cm ; épaisseur du support : 0,5 mm. Après 12 h de repos à la température du laboratoire, les plaques sont activées à 110°, pendant 30 mn .

Sur ces plaques, seront déposés 10 µg des alcaloïdes suivants, en solution chloroformique ou chloroformo-alcoolique : sulfate de quinine (Q) Prolabo, sulfate de quinidine (QD) Nativelle, chlorhydrate de dihydroquinidine (HDQ) Houdé, chlorhydrate de cinchonine (C) Prolabo, cinchonidine (CD) Prolabo .

Les migrations se feront de manière ascendante, à 22° C . Onze phases mobiles ont été retenues :

1	chloroforme/acétone/diéthylamine	50/40/10
2	benzène/acétate d'éthyle/diéthylamine	70/20/10
3	cyclohexane/chloroforme/diéthylamine	50/40/10
4	cyclohexanol/cyclohexane/hexane/diéthylamine	30/30/30/5
5	chloroforme/méthanol/diéthylamine	80/20/0,2
6	chloroforme/diéthylamine	90/10
7	chloroforme/méthanol/diéthylamine	80/20/1
8	méthanol/acétone	80/20
9	acétone/méthanol/diéthylamine	50/50/1
10	méthanol	
11	méthylal/diéthylamine	90/10

Après migration sur une distance de 11 cm, les plaques sont retirées et mises à l'étuve à 100° jusqu'à évaporation du solvant.

Les chromatogrammes sont révélés successivement selon deux procédés. Tout d'abord, après pulvérisation d' H_2SO_4 0,5 N, la plaque est examinée sous lumière U.V. (350nm). La quinine, la quinidine et l'hydroquinidine apparaissent sous forme de taches fluorescentes bleues. Ensuite, on pulvérise le réactif de DRAGGENDORF, modifié selon MUNIER et MACHEBOEUF. Tous les alcaloïdes envisagés prennent une coloration orangée.

Résultats - Discussion

Nos résultats sont consignés dans les tableaux I et II .

Tableau I

Phase mobile n°	Durée de la migration (mn)	Rf					Forme des taches
		Q	QD	HQD	C	CD	
1	42	0,27	0,47	0,46	0,56	0,42	ronde
2	38	0,16	0,28	0,26	0,35	0,25	"
3	58	0,06	0,14	0,14	0,24	0,17	"
4	135	0,32	0,41	0,38	0,47	0,50	"
5	51	0,50	0,50	0,56	0,39	0,37	étirée + traînées
6	43	0,22	0,42	0,34	0,50	0,34	ronde
7	38	0,32	0,41	0,52	0,46	0,42	étirée + traînées
8	35	0,36	0,36	0,22	0,28	0,30	ronde
9	28	0,31	0,29	0,18	0,20	0,25	"
10	40	0,33	0,33	0,20	0,25	0,32	"
11	32	0,29	0,56	0,51	0,69	0,52	"

Tableau II

Phase mobile n°	Nombre de taches secondaires				
	Q	QD	HQD	C	CD
1	0	0	0	1	1
2	0	0	0	1	1
3	0	0	0	1	1
4	0	0	0	1	1
5	0	0	0	1	1
6	0	0	0	1	1
7	0	0	0	1	1
8	1	1	1	3	3
9	1	1	1	1	1
10	1	1	1	3	3
11	0	0	0	1	1

Les phases mobiles retenues peuvent, en fonction des résolutions qu'elles permettent, se répartir en 3 groupes :

1er groupe : les phases 6 et 11 séparent nettement les 5 alcaloïdes envisagés ; en particulier, la quinidine est bien séparée de la quinine et de l'hydroquinidine.

2ème groupe : les phases 1, 2, 3 séparent quinine, quinidine, cinchonine et cinchonidine, mais ne permettent pas la différenciation quinidine dihydroquinidine.

3ème groupe : les solvants 8, 9, 10 présentent le seul avantage, mais il n'est pas négligeable, de séparer la quinidine de la dihydroquinidine.

Les solvants 5 et 7 sont d'un intérêt médiocre, car les spots des alcaloïdes sont très étirés. Quant à la migration avec le solvant 4, elle est beaucoup trop lente.

Les solvants du 3ème groupe nous ont montré que la quinidine, alcaloïde sur lequel nous avons concentré nos efforts, est souillée par un composé fluorescent, révélé par le réactif de DRAGGENDORF et possédant le même R_f que la dihydroquinidine. D'autre part, à la quinine et à la dihydroquinidine, sont respectivement associées de la dihydroquinine et de la quinidine. Quant à la cinchonine et la cinchonidine, elles renferment respectivement de la quinidine et de la quinine, et peut-être des traces de leurs hydrobases correspondantes.

2.2. Essais quantitatifs

Partie expérimentale

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé la teneur en dihydroquinidine de la quinidine "Nativelle" .

Après dépôt sur gel de silice de 10 μ g de quinidine et migration dans le méthanol, la plaque est pulvérisée par de l'acide sulfurique 0,1 N et observée

en lumière ultraviolette. Les taches correspondant à la quinidine et à la dihydroquinidine sont repérées puis grattées à l'aide d'une petite spatule (les taches sont isolées sur une surface sensiblement supérieure à celle révélée sous U.V.) . Sera également isolée une surface de la plaque ne comportant aucun alcaloïde, qui servira de témoin blanc.

Dans chaque tube, sont ajoutés III gouttes de soude N et 5 ml d'un mélange éthanol absolu/acétone à parties égales. Après bouchage, les tubes sont agités pendant 30 mn, puis centrifugés. Les surnageants acidifiés par III gouttes d'acide sulfurique à 20 % sont spectrofluorimétrés (λ_{exc} : 355 nm - λ_{fl} : 461 nm) . Deux prises d'essais étalon de quinidine - 10 et 1 μ g - contenues dans 5 ml du mélange alcool/acétone précédent seront fluorimétrés dans les mêmes conditions.

Résultats

Pour un dépôt de quinidine de 10 μ g, le taux de récupération de l'alcaloïde (ou plus exactement du mélange d'alcaloïdes : quinidine + hydroquinidine) est de $78,4 \pm 8,2$ % .

La quinidine "Nativelle" que nous avons testée renferme $4,7 \pm 0,8$ % d'hydroquinidine.

3. CONCLUSION

La quinidine que nous utiliserons n'est pas chromatographiquement pure. Elle renferme environ 5 % d'hydroquinidine. Néanmoins, elle se prête parfaitement à une étude de métabolisme.

Chapitre Second

Dosage de la Quinidine (ou Quinine) dans les Milieux Biologiques

P L A N

1. TRAVAUX ANTERIEURS

1.1. Méthodes colorimétriques

1.2. Méthodes physiques

1.2.1. Spectrofluorimétriques

1.2.1.1. Méthodes par extraction

1.2.1.2. Méthodes par défécation

1.2.1.3. Comparaison des résultats

1.2.1.4. Spécificité des méthodes spectrofluorimétriques

1.2.2. Spectrographiques

1.2.3. Polarographiques

1.3. Conclusion

2. TRAVAUX PERSONNELS

2.1. Technique de dosage proposée

2.1.1. Principe

2.1.2. Réactifs

2.1.3. Mode opératoire

.../...

2.2. Etude et justification expérimentale de la méthode proposée

2.2.1. Choix du solvant d'extraction

2.2.2. pH d'extraction

2.2.3. Rôle de l'alcool isoamylique

2.2.4. Lavage alcalin de la phase organique

2.2.5. Reproductibilité

2.2.6. Spécificité

2.2.7. Sensibilité

2.3. Contrôle chromatographique de la méthode - Utilisation d'autres solvants d'extraction que le benzène - Résultats

2.3.1. Technique

2.3.2. Résultats

2.3.3. Discussion

2.3.4. Conclusion

3. CONCLUSION

1. TRAVAUX ANTERIEURS

Parmi les semi-microméthodes permettant le dosage de la quinidine ou de la quinine dans les milieux biologiques, nous distinguerons deux groupes de méthodes : d'une part les méthodes colorimétriques, d'autre part les méthodes physiques : fluorimétriques, spectrographiques et polarographiques.

1.1. Méthodes colorimétriques

Le principe de ces méthodes repose sur le fait que certains colorants acides donnent avec les bases organiques en général, et les alcaloïdes en particulier, des combinaisons colorées. Celles-ci sont solubles dans les solvants organiques auxquels elles communiquent une coloration photométrable.

PRUDHOMME (24) exploita le premier cette propriété pour le dosage de la quinine dans les liquides biologiques et les organes. Il utilisait l'éosine.

Par la suite, BRODIE et Coll. (25, 26) préconisant le méthylorange, codifièrent cette méthode et étendirent son champ d'application à un grand nombre d'alcaloïdes ou de bases organiques de synthèse.

Ceux-ci sont extraits des milieux biologiques rendus alcalins, par le dichloro-éthane, ou mieux, par le benzène. La phase organique est ensuite agitée

avec une solution borique de méthylorange dont on enlève l'excès par aspiration. Puis la combinaison base-méthylorange est détruite par acidification. Le méthylorange alors libéré se solubilise dans la phase acide que l'on colorimètre.

Cette méthode a été jusqu'à présent très largement utilisée. Mais on peut lui adresser une critique importante : elle est en effet dépourvue de spécificité ; il est donc difficile de lui faire appel pour des dosages cliniques. En outre, des substances normalement présentes dans les tissus et liquides biologiques donnent un complexe coloré avec le méthylorange et sont ainsi dosées en même temps que le composé basique.

Enfin, HASSELMANN (27) s'inspirant des travaux de PRUDHOMME et BRODIE, étudia les propriétés physiques et la nature des combinaisons entre la quinidine et les colorants dihydroxyfluoranniques : éosine, érythrosine, rose bengale. Il propose un dosage sanguin et urinaire de la quinidine peu différent d'ailleurs de celui de PRUDHOMME .

1.2. Méthodes physiques

1.2.1. Spectrofluorimétries

1.2.1.1. Méthodes par extraction

La première méthode digne d'intérêt a été publiée en 1942 par KELSEY et GEILING (28). Elle consiste à traiter l'échantillon biologique, à chaud, par de la soude à 2 % . La quinidine est ensuite extraite par l'éther, qui, après avoir subi deux lavages alcalins, est épuisé par de l'acide sulfurique 0,1 N que l'on spectrofluorimètre.

Cette technique douée d'une grande spécificité permet, selon les auteurs, l'extraction de l'alcaloïde à $99,8 \pm 1,5$ % .

De nombreuses variantes et améliorations ont été proposées à cette méthode :

- le traitement à chaud a été abandonné car il s'est révélé inutile.

- d'autres solvants d'extraction, moins polaires que l'éther ont été conseillés :

dichloroéthane : BRODIE (25)
 EDGAR (29)

benzène : BRODIE (30, 31)
 UDENFRIEND (32)

- enfin, CRAMER (33) constatant une perte de quinidine de 10 % supprime le lavage alcalin de la phase organique extractive .

D'autre part, dans un but de simplification, certains auteurs (29) spectrofluorimètrisent directement le solvant d'extraction acidifié par l'acide trichloracétique.

1.2.1.2. Méthodes par défécation

Un autre type de techniques spectrofluorimétriques, peu adaptées aux dosages tissulaires mais permettant cependant des dosages sanguins, consiste à effectuer une défécation du plasma par de l'acide métaphosphorique (34, 35) ou par de l'acide trichloracétique (36). Le filtrat acide est ensuite spectrofluorimétré.

Par contre, BALATRE (37) et HAMFELT (38) préfèrent utiliser comme agent défécant un mélange alcool-acétone dont ils mesurent la fluorescence avant et après acidification sulfurique.

Mais la présence normale dans les filtrats de substances "éteignant" la fluorescence (quenching estimé à 17 % par BRODIE) complique la préparation des solutions étalons. Celles-ci sont obtenues en ajoutant des quantités connues de quinidine à des filtrats de sérums déféqués, sérums provenant de sujets non traités.

1.2.1.3. Comparaison des résultats

EDGAR et SOKOLOW (29) d'une part, GELFMAN et SELIGSON (36) d'autre part, ont comparé les résultats obtenus au moyen des méthodes par extraction et par défécation. Ils sont en accord pour affirmer que les méthodes par précipitation donnent des résultats supérieurs, estimés à 50 % par GELFMAN mais pouvant atteindre 200 % (!) selon CRAMER (33) .

Ces différences très importantes s'expliquent, comme l'a démontré HARTEL (39), par le fait que les méthodes par précipitation dosent la quinidine et tous les métabolites fluorescents, alors que les méthodes par extraction dosent la quinidine et une fraction des métabolites seulement.

D'autre part, CRAMER (33) a comparé quatre méthodes extractives. Si les résultats obtenus sont voisins lorsque les dosages sont effectués sur des solutions pures de quinidine, il en va tout autrement pour des sérums de malades traités ; en effet, les résultats diffèrent selon le solvant utilisé, l'extraction des métabolites étant d'autant plus grande que le solvant est plus polaire.

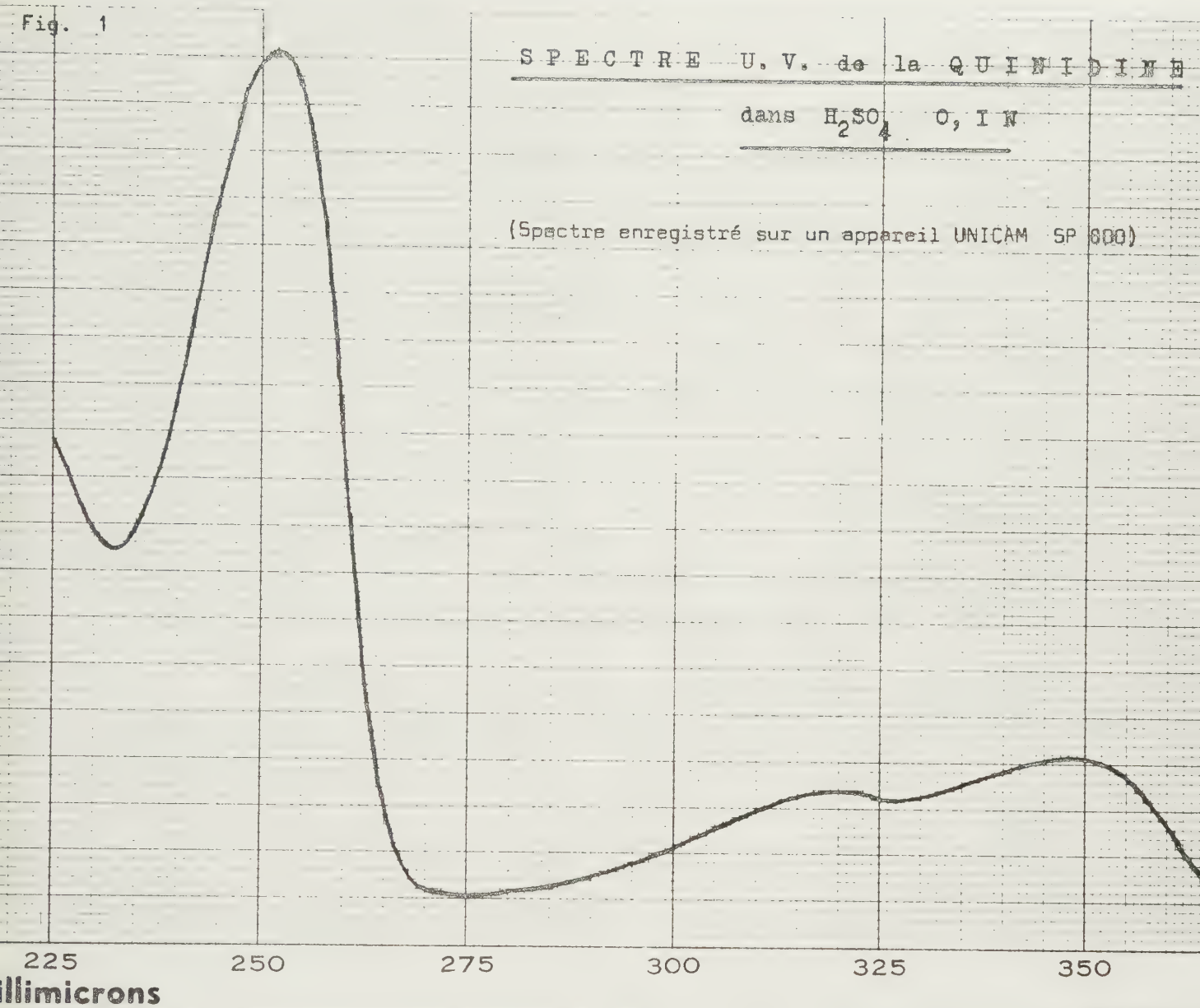
1.2.1.4. Spécificité des méthodes spectrofluorimétriques

EDGAR et SOKOLOW (29) ont vérifié que chez des patients recevant - aspirine, codéine, morphine, péthidine, phénobarbital, sécobarbital, pentobarbital, vitamines B₁, C, K, sulfamides, pénicilline, digitaline, insuline, stilboestrol - le dosage n'est pas perturbé. De même, le bleu Evans, la B.S.P., la P.S.P., n'apportent aucune gêne dans le dosage.

1.2.2. Spectrographiques

La quinidine présente dans l'U.V. trois maximums d'absorption dont le plus important est situé à 250 nm, les deux autres étant à 318 et 347 nm (fig. 1). Un dosage spectrophotométrique est donc possible.

Fig. 1



JOSEPHSON (40) effectue une extraction par le dichloroéthane tandis que KAYE (41) utilise le chloroforme. Le solvant organique est ensuite lavé par une solution de borate de soude puis épuisé par de l'acide sulfurique 0,1 N. On spectrophotomètre à 250 nm.

Cette méthode, facile à réaliser, est cependant moins sensible, moins spécifique, que les méthodes spectrofluorimétriques.

1.2.3. Polarographiques

MERVILLE et DEQUIDT (42) ont proposé une technique de dosage polarographique de la quinine dans les milieux biologiques. Cette technique est également valable pour la quinidine.

Ils obtiennent un polarogramme caractérisé par une vague catalytique en forme de clocher dont le potentiel plus positif que celui dû au dépôt des ions hydrogène est de $-1,74$ volt. Ce potentiel, ainsi que la hauteur du clocher, sont sous la dépendance très stricte du pH de la solution et de la concentration en électrolyte du support."

Pour un pH et une concentration en électrolyte donnés, la hauteur du clocher est proportionnelle à la concentration de l'alcaloïde en solution.

Il semble que cette méthode soit très difficilement applicable à la détermination de la quinidine dans les tissus et qu'elle ne se prête pas aux dosages en série.

1.3. Conclusion

Dans le cadre d'une étude poussée du métabolisme de la quinidine chez l'animal, seules les méthodes spectrofluorimétriques extractives semblent satisfaisantes. Le problème majeur réside dans le choix approprié d'un solvant : le benzène paraît être le meilleur (30, 32).

Encore faut-il savoir s'il permet une extraction quantitative de la quinidine et quels métabolites il est susceptible d'entraîner.

2. TRAVAUX PERSONNELS

2.1. Technique de dosage proposée

2.1.1. Principe

La quinidine est extraite en milieu alcalin par le benzène qui subit ensuite deux lavages visant à éliminer les métabolites éventuellement entraînés. La phase organique extractive est épuisée par de l'acide sulfurique dont on mesure la fluorescence.

2.1.2. Réactifs

1/ Solution mère de quinidine à 100 mg/litre

Peser 120,7 mg de sulfate de quinidine $(C_{20}H_{24}O_2N_2)_2$, H_2SO_4 , 2 H_2O et compléter à 1 litre par de l'acide sulfurique 0,1 N .

Conservée à + 4°C en flacon de verre teinté, cette solution est stable. Elle sera utilisée pour préparer, par dilution dans l'eau distillée, une solution de travail à 1 mg/litre dont la stabilité excède une semaine.

2/ Solution de soude 0,1 N

3/ Solution d'acide sulfurique 0,1 N

4/ Benzène lavé et distillé :

500 ml de benzène sont lavés avec 100 ml de HCl 0,1 N puis 100 ml de NaOH 0,1 N, enfin avec 3 fois 100 ml d'eau distillée.

Le benzène lavé est ensuite distillé (P.E. 80°C) dans un appareil dont toutes les parties s'adaptent par rodages (des joints en caoutchouc pourraient céder des substances fluorescentes). Seul le coeur du distillat est conservé.

5/ Alcool isoamylique lavé et distillé

500 ml d'alcool isoamylique sont lavés avec deux fois 100 ml de H_2SO_4 à 25 % puis avec deux fois 100 ml d'eau distillée, enfin avec une solution diluée de $NaHCO_3$. On distille ensuite, comme pour le benzène (P.E. $131^\circ C$).

Toute la verrerie - ballons jaugés, pipettes, tubes à centrifuger, tubes à essais, etc ... - est lavée après chaque usage au mélange sulfochromique puis rincée abondamment à l'eau distillée.

2.1.3. Mode opératoire

Dans un godet à fond rond et à bouchon rodé de 50 ml, on introduit 30 ml de benzène et 1 ml de plasma alcalinisé par 1 ml de $NaOH$ 0,1 N. On agite mécaniquement 30 mn et on centrifuge si nécessaire.

Par aspiration, la phase aqueuse est éliminée. On ajoute 1 ml d'alcool isoamylique au benzène ; on homogénéise et on lave la phase organique deux fois, par agitation (5 mn), avec 10 ml de $NaOH$ 0,1 N. 20 ml du solvant extractif sont ensuite ajoutés à 3 ml de H_2SO_4 0,1 N. Après une agitation de 10 mn, on élimine par aspiration la phase organique.

Le dosage se termine par la mesure de la fluorescence de l'acide sulfurique (fig. 2) :

λ_{Exc} 355 nm

λ_{Fl} 461 nm

(longueurs d'onde non corrigées - Mesures effectuées sur un spectrofluorimètre JOBIN-YVON, type BEARN)

Des dosages effectués selon ce protocole sur des prises d'essai allant de 0 à 15 μg de quinidine montrent que l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration (fig. 3) .

Cette technique s'applique à tous les échantillons biologiques : plasma, globules rouges, L.C.R., urine, bile, homogénéisats de tissus (1 g de tissu broyé dans 20 ml de HCl 0,1 N) .

Fig. 2

SPECTRES d' EXCITATION et de FLUORESCENCE de la

QUINIDINE dans H_2SO_4 0,1 N

Maximum d' Excitation 355 m μ

Maximum de Fluorescence 461 m μ

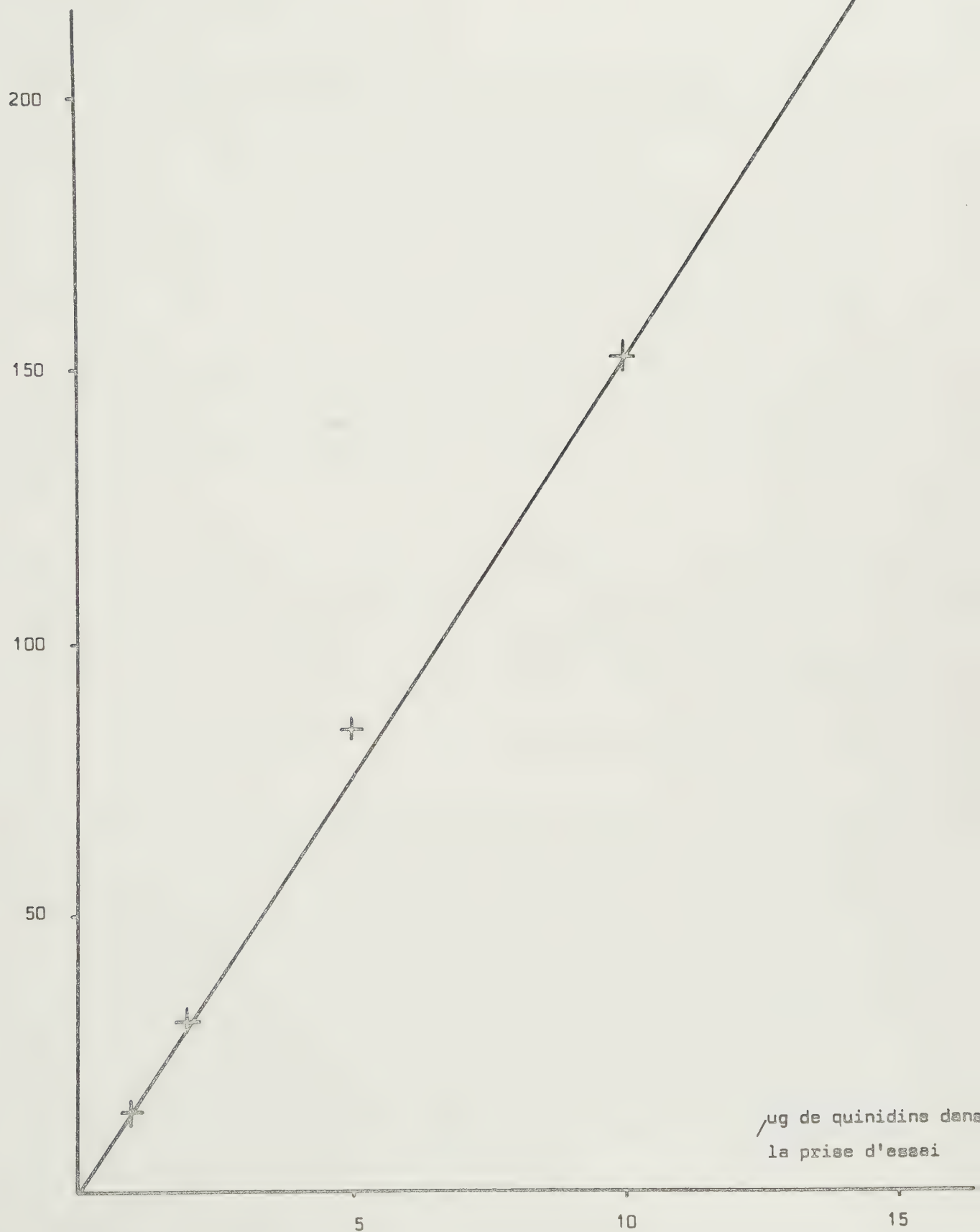
EXCITATION

FLUORESCENCE



intensité de fluorescence
(unités arbitraires)

- 25 -



µg de quinidine dans
la prise d'essai

Fig. 2. Intensité de la fluorescence en fonction de la concentration en quinidine.

2.2. Etude et justification expérimentale de la méthode proposée

2.2.1. Choix du solvant d'extraction

Parmi les solvants généralement utilisés en spectrofluorimétrie pour l'extraction des composés basiques, figurent par ordre de polarité décroissante le n-butanol, l'éther sulfurique, le dichloro-1,2 éthane, le benzène et l'heptane.

Tous ces solvants couvrent une grande échelle de polarité et leur qualité technique est satisfaisante pour des usages spectrofluorimétriques, à la condition que les impuretés fluorescentes soient éliminées par des lavages acides et alcalins (éventuellement par passage du solvant sur des colonnes de silice) et par distillation.

Pour un alcaloïde, le solvant de choix est celui qui l'extraît quantitativement en entraînant le moins de métabolites interférents. Or BRODIE a énoncé qu'en règle générale, les métabolites sont plus polaires que le composé initial ; ce serait le cas de la quinidine dont les deux métabolites principaux seraient des dérivés hydroxylés : l'un de nature alcoolique, l'autre de nature phénolique.

Il faut donc utiliser le solvant le moins polaire permettant l'extraction la plus quantitative.

Parmi les solvants que nous avons essayés, l'heptane et l'alcool isoamylique n'extraient la quinidine de ses solutions aqueuses que de façon incomplète : respectivement à 77 et 91 % . Par contre, l'extraction est totale avec l'éther, le dichloroéthane, le chloroforme et le benzène, solvant que nous choisissons en raison de sa moindre polarité. Le benzène présente en outre l'avantage de ne s'émulsionner que difficilement par agitation, ce qui évite de nombreuses centrifugations. Mais en raison de sa toxicité, quelques précautions doivent être prises en cours de manipulation (pièce ventilée, propipettes ...).

D'autre part, certains auteurs ayant laissé entendre que les liaisons entre les albumines plasmatiques et la quinidine pouvaient amoindrir l'extraction, nous avons voulu vérifier cette hypothèse.

Pour cela, nous avons ajouté des quantités connues de quinidine à du plasma de façon à obtenir des concentrations de 0,5 , 1 , 2 , 5 et 10 $\mu\text{g/ml}$. Nous laissons l'équilibre s'établir pendant 4 heures à la température du laboratoire et nous effectuons les dosages.

Les résultats obtenus, consignés dans le tableau ci-dessous montrent que l'extraction est excellente puisque nous retrouvons $100,8 \pm 7,9 \%$ de la quinidine ajoutée.

Tableau III

Quinidine ajoutée à 1 ml de sérum	Quinidine retrouvée	% de "récupération"
0,5 μg	0,53	106
	0,51	102
	0,53	106
	0,49	98
1 μg	1,02	102
	0,99	99
	0,99	99
	1,02	102
	1,06	106
2 μg	1,95	97,5
	1,95	97,5
	2,01	100,5
	2	100
	2	100
5 μg	4,97	99,5
	5	100
	5,17	103,5
	4,95	99
	4,90	98
10 μg	9,7	97
	9,75	97,5
	9,80	98
	10	100
	9,70	97

2.2.2. pH d'extraction

Nous avons effectué, à différents pH (5, 6, 7, 8, 9, 10, 14), une série d'extractions benzéniques sur une prise d'essai de 1 μ g de quinidine.

Les résultats figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau IV

pH d'extraction	Prise d'essai	Quantité retrouvée	%
5	1 μ g	0,65	65
6	1 "	0,67	67
7	1 "	0,91	91
8	1 "	1,00	100
9	1 "	1,00	100
10	1 "	1,00	100
14	1 "	1,00	100

Un pH supérieur à 8 est donc nécessaire pour que l'extraction soit quantitative.

2.2.3. Rôle de l'alcool isoamylique

L'adsorption par les parois de verre de composés en solution dans des solvants organiques peut constituer une source d'erreur importante lorsque les quantités dosées sont de l'ordre du μ g. Cette adsorption dépend du composé et du solvant organique ; elle est d'autant plus grande que le solvant est moins polaire (30), mais elle est réduite si, l'extraction une fois effectuée, on ajoute au solvant quelques ml d'alcool - éthylique ou isoamylique - et si la verrerie utilisée est parfaitement propre (43) .

2.2.4. Lavage alcalin de la phase organique

Ce lavage a pour but d'éliminer les métabolites éventuellement entraînés au cours de l'extraction. Mais il est très discuté par certains auteurs. C'est ainsi que CRAMER (33) constatant sur une solution pure de quinidine une perte de 10 % néglige cette purification, alors qu' UDENFRIEND (32) l'estime inutile, le benzène n'extrayant d'après lui que la quinidine.

Les résultats que nous avons obtenus donnent à penser que ce lavage doit être maintenu.

En effet, nous n'avons observé qu'une perte de quinidine négligeable (inférieure à 2 %) au cours de lavages répétés de la phase organique, que l'extraction concerne une solution aqueuse (fig. 4) ou un sérum "chargé" en quinidine :

Tableau V

Quantité de quinidine ajoutée à 1 ml de sérum	Quantité retrouvée	
	avant lavage	après 2 lavages
1 μ g	1,06 μ g	0,98 μ g
2 "	2 "	2,01 "
5 "	4,90 "	4,85 "
10 "	9,70 "	9,80 "

nsité de fluorescence
(unités arbitraires)

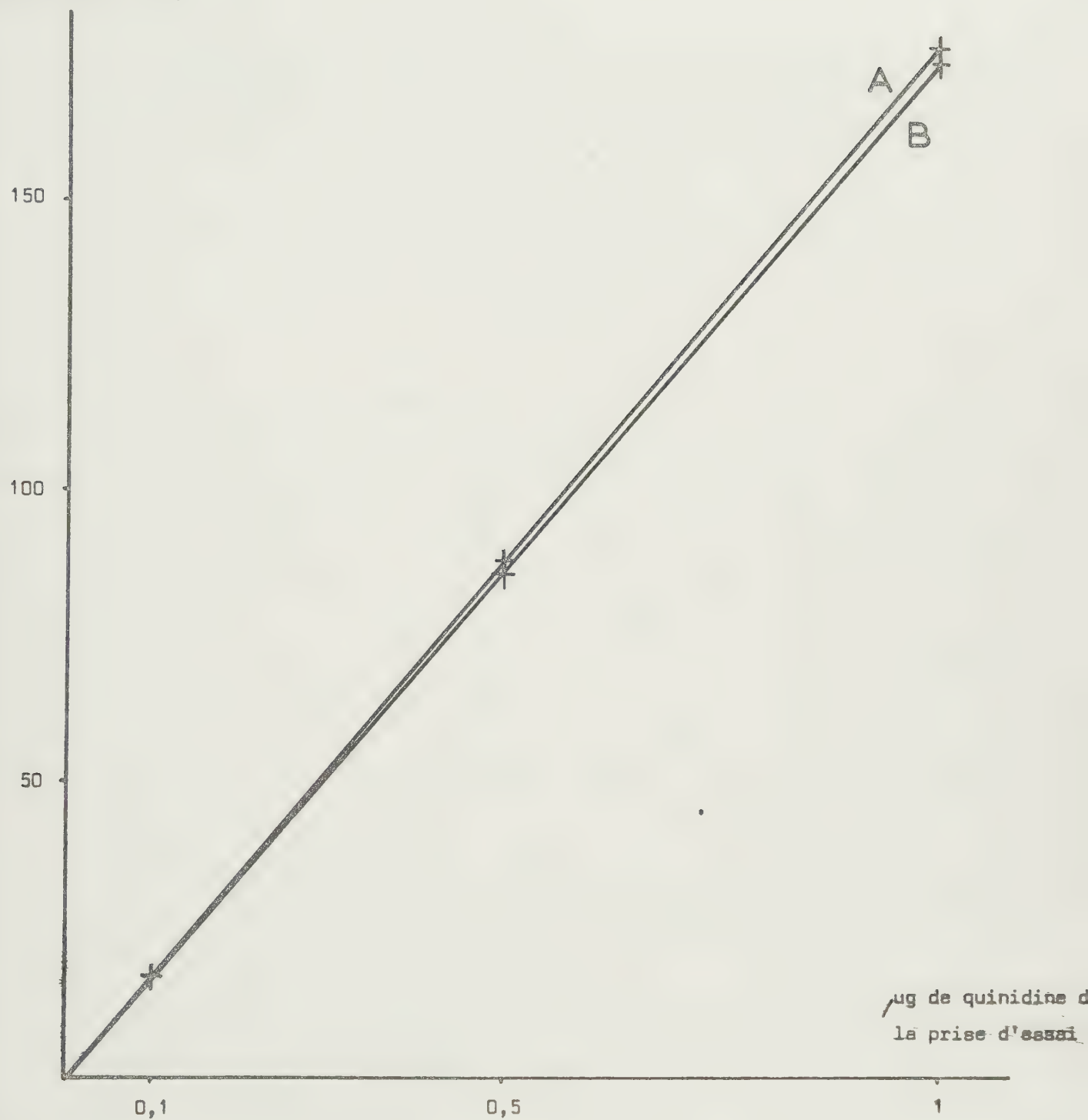


Fig. 4 Influence de 2 lavages de la phase organique extractive par 2 fois 10 ml de soude 0,1 N .

D'autre part, en réalisant des dosages hépatiques, urinaires, biliaires, chez des chiens intoxiqués à la quinidine, nous avons contrôlé de très nombreuses fois que le benzène entraîne des substances fluorescentes (métabolites ?) dont on peut se débarrasser par deux lavages alcalins.

Nous donnons ci-dessous un exemple particulièrement démonstratif de l'efficacité de ces lavages ; deux séries de dosages ont été effectuées : l'une avec lavage de la phase organique, l'autre sans.

Tableau VI

Urines recueillies du temps au temps	Concentration de quinidine		Rendement du lavage
	avant lavage	après lavage	
0 15' après I.V.	208 $\mu\text{g/ml}$	210 $\mu\text{g/ml}$	+ 1 %
15' 45' " "	325 "	315 "	- 3 %
45' 2h " "	198 "	174 "	- 12 %
2h 4h " "	23,5 "	18,5 "	- 21 %
4h 6h " "	24,5 "	17,5 "	- 21 %
6h 8h " "	27,5 "	19,5 "	- 30 %

A mesure que l'intoxication se développe, l'efficacité du lavage devient donc plus grande, ce qui nous laisse logiquement penser que la part prise par les métabolites va croissant .

Nous avons fait les mêmes constatations à propos de dosages biliaires. Il est bien évident qu'une vérification faisant appel à des méthodes chromatographiques devra être effectuée (cf p.33) .

2.2.5. Reproductibilité

Sur le plasma d'un malade soumis à une thérapeutique quinidinique, nous

déterminons la quinidinémie 1, 2, 4 et 7 jours après le prélèvement, le plasma étant conservé à + 4°C .

Les résultats ci-dessous montrent que la méthode de dosage est d'une grande reproductibilité et que la quinidine ne subit aucune altération : - -

1er jour	4,5	ug/ ml
2ème jour	4,45	"
4ème jour	4,40	"
7ème jour	4,45	"

2.2.6. Spécificité

Des prélèvements biologiques d'origine animale auxquels a été appliqué le protocole de dosage précédemment décrit, présentent une fluorescence très faible, quasiment négligeable :

Plasma, hématies	fluorescence nulle
Bile	0,1 ug/ ml
Muscle, poumon	0,1 ug/ g
Rate, cerveau	0,2 ug/ g
Rein	0,3 ug/ g
Foie	0,4 ug/ g

Ces résultats sont exprimés en quinidine-base

D'autre part, les médicaments suivants : barbituriques, aspirine, imipramine, benzodiazépines, méprobamate ne perturbent pas le dosage de la quinidine dans les milieux biologiques .

2.2.7. Sensibilité

Ce protocole de dosage permet de doser jusqu'à 0,01 ug (soit 10 ng) de quinidine par ml de liquide biologique.

2.3. Contrôle chromatographique de la méthode - Utilisation d'autres solvants d'extraction que le benzène - Résultats

Dans l'étude de cette méthode de dosage, nous avons voulu aller plus loin. A l'aide de la chromatographie en couche mince, nous avons vérifié que des composés fluorescents, autres que la quinidine, étaient extraits par le benzène. Nous avons déterminé leur importance relative et nous avons apprécié l'influence du lavage. En outre, cette étude a été étendue à d'autres solvants d'extraction que le benzène.

2.3.1. Technique

Les urines d'un chien intoxiqué par l'injection I.V. de 10 ml de quinidine par kg de poids sont recueillies à 0°, pendant 6 heures.

1 ml de cette urine homogénéisée est alcalinisé, puis extrait par 5 ml de benzène, au cours d'une agitation de 30 mn. 200 μ l de la phase organique sont alors déposés sur une plaque de gel de silice (Merck n° 7731) ; épaisseur du support : 0,5 mm. De nouveau, 200 μ l de la phase benzénique seront déposés après que celle-ci ait été lavée 2 fois par 1,5 ml de NaOH 0,1 N . Enfin, le solvant organique est épuisé par 1 ml de H₂SO₄ 0,1 N et un troisième dépôt de 200 μ l est effectué.

On réalise donc 3 dépôts successifs de la phase extractive : un avant lavage alcalin, un après lavage, un 3ème après épuisement par H₂SO₄ . Ainsi, seront jugées la qualité de l'extraction et la qualité du lavage. Parallèlement, un dépôt témoin de 10 μ g de quinidine est effectué.

Le benzène, mais également l'éther, le dichloroéthane, le chloroforme et l'alcool isoamylique ont été soumis à ce protocole, exactement dans les mêmes conditions.

Les plaques chromatographiques sont développées dans le méthanol, sur 15 cm environ. Après séchage et pulvérisation d'H₂SO₄ 0,1 N, les chromatogrammes sont examinés sous U.V. . On distingue 4 zones fluorescentes a , b , c , d (fig. 5) ; ces zones sont repérées, isolées et dosées (cf chapitre précédent 3. Essais quantitatifs) :

2.3.2. Résultats

Les chromatogrammes sous U.V. apparaissent ainsi :

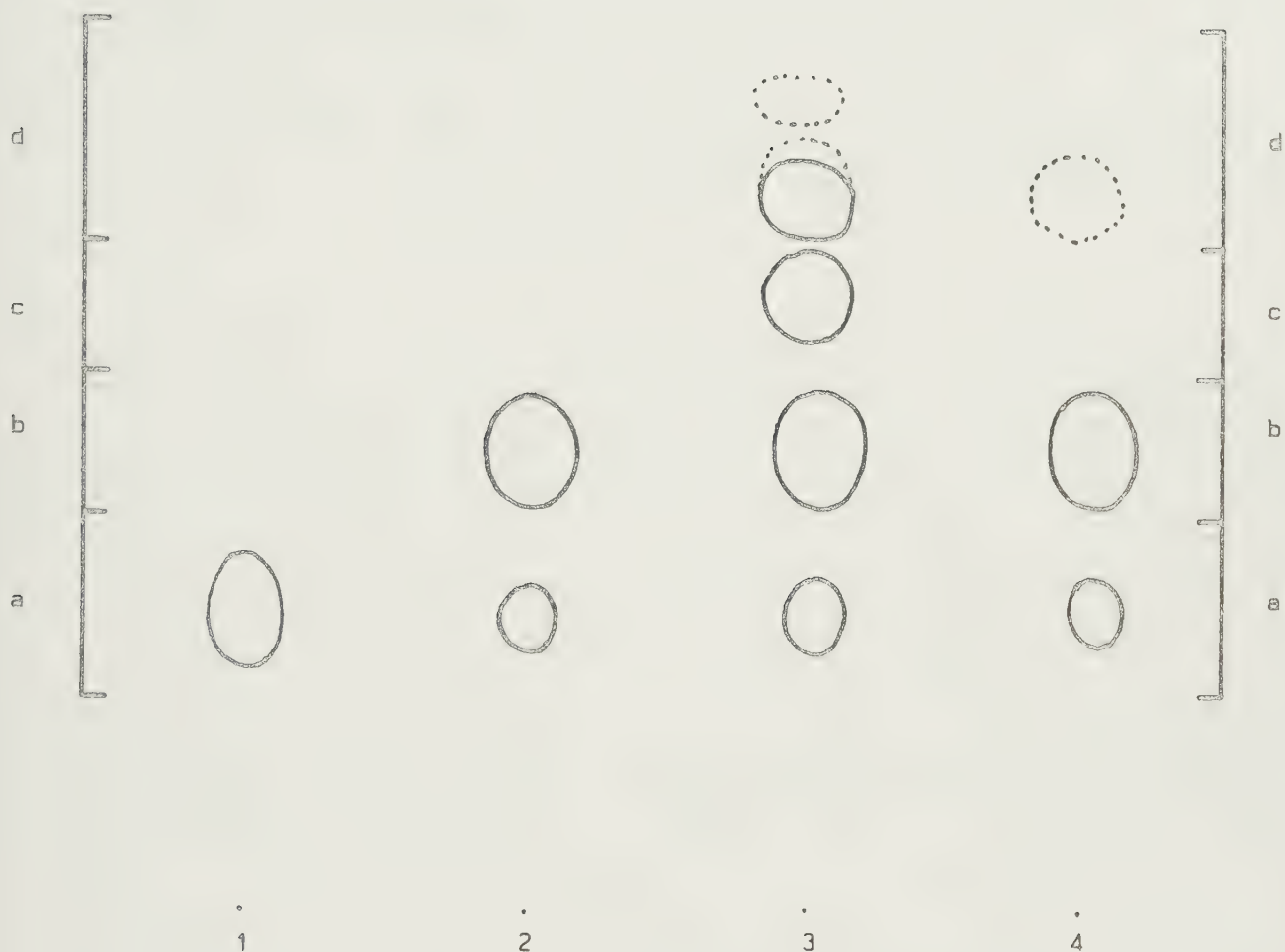


Fig. 5 Séparation de la quinidine et de ses métabolites urinaires par chromatographie en couche mince : aspect du chromatogramme examiné sous U.V., après pulvérisation d' H_2SO_4 0,1 N .

1 = dihydroquinidine

2 = quinidine "Nativelle"

3 = extrait benzénique urinaire

4 = extrait benzénique lavé

La dihydroquinidine (HQD) + un métabolite constituent la fraction a . La fraction b représente de la quinidine pure, tandis que les fractions c et d renferment chacune un métabolite principal.

Nos résultats sont portés dans le Tableau VII et sont illustrés par la figure 6 .
Ils sont exprimés en $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'urine. Pour les calculs, il a été tenu compte du
taux de récupération des composés à partir du chromatogramme.

Tableau VII - Effet de différents solvants sur l'extraction urinaire de la quini-
dine et de ses métabolites. Importance du lavage alcalin de la pha-
se extractive .

	Benzène		Ether		Dichloroéthane	
	Avant lavage	Après lavage	Avant	Après	Avant	Après
Fraction a	4,50	4,25	9,9	7,00	10,25	7
" b	109	107,5	110,25	110,25	110	110
" c	3	0	5,20	1,60	8,25	3,5
" d	8,75	traces	16	8,55	17	9,25
a + b + c + d	125,25	111,75	141,35	127,40	145,50	129,75

	Chloroforme		Alcool isoamylique	
	Avant	Après	Avant	Après
Fraction a	17,50	9,75	32,50	33
" b	114	114	109	109
" c	11,90	9,75	14,25	11,5
" d	20,25	16,75	18	18
a + b + c + d	163,65	150,25	173,75	171,5

de quinidine par
1 l d'urine

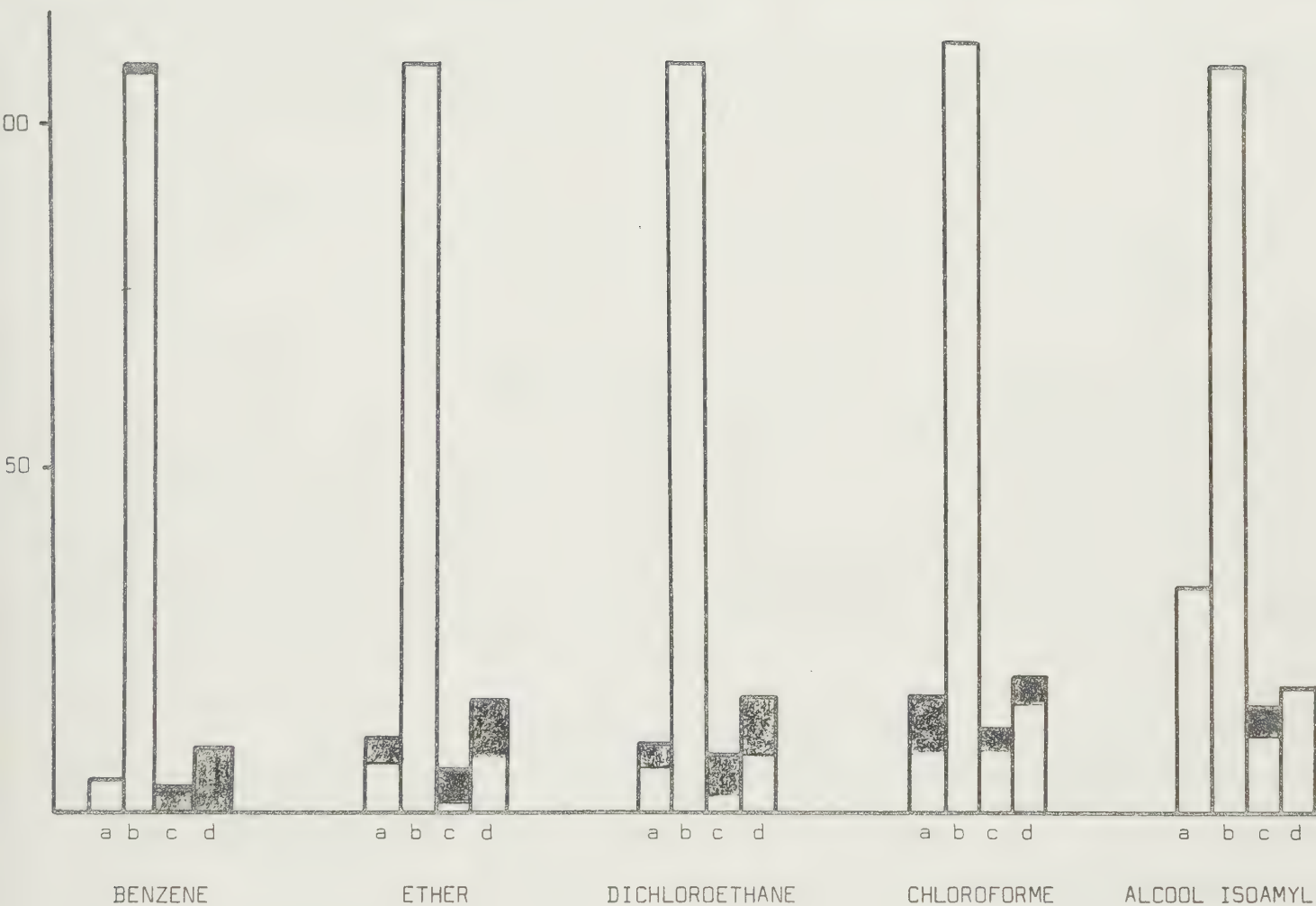


Fig. 6 Extraction urinaire de la quinidine et de ses métabolites. Les zones grises représentent la part éliminée par le lavage alcalin de la phase organique.

2.3.3. Discussion

Ces résultats montrent que le choix du solvant d'extraction, en vue du dosage de la quinidine dans les milieux biologiques, ne doit pas être aveugle. En effet les résultats sont d'autant plus élevés que la polarité du solvant est plus grande, car la part prise alors par les métabolites va croissant (Tableau VIII). Par contre, quel que soit le solvant, la quinidine est extraite quantitativement, ce qu'avait d'ailleurs déjà constaté HARTEL (44). Cependant, l'alcool isoamylique,

à la différence des autres solvants, n'est pas épuisé totalement par H_2SO_4 0,1 M lors de la dernière étape du dosage.

Quant au lavage alcalin de la phase organique, il est efficace, et ce d'autant plus que le solvant est moins polaire (Tableau VIII) .

Tableau VIII - Métabolites extraits par différents solvants lors d'un dosage urinaire de la quinidine. Effet du lavage alcalin de la phase extractive .

		Benzène	Ether	Dichloroéthane	Chloroforme	Alcool isoamylique
Fractions a + c + d (= métabolites + HQD) µg/ ml	Avant lavage	16,25	31,1	35,5	49,65	64,75
	Après lavage	4,25	17,15	19,75	36,25	62,5

Dans le cas du benzène, ce lavage, sans entraîner de perte de quinidine, ôte pratiquement tous les métabolites extraits, de telle sorte que le protocole que nous utilisons ne dose que la quinidine (+HDQ) .

Dans le cas de l'éther et du dichloroéthane, le lavage bien qu'utile est d'une efficacité moindre.

Enfin, le chloroforme et l'alcool isoamylique ne sauraient être employés pour doser la quinidine car ils extraient une trop grande part de métabolites (Tableau VIII) .

2.3.4. Conclusion

Le benzène est le solvant d'extraction le mieux approprié pour le dosage de la quinidine dans les milieux biologiques, car, d'une part, il extrait peu de métabolites, d'autre part, il est possible de se débarrasser de ces derniers par lavage alcalin de la phase benzénique.

3. CONCLUSION

La méthode de dosage de la quinidine dans les milieux biologiques que nous proposons donne entière satisfaction. Relativement rapide, elle se prête aux séries importantes et possède les critères qui font la valeur d'une méthode : sensibilité, reproductibilité, spécificité.

Chapitre Troisième

Sort de la Quinidine dans l'organisme

Etude chez le Chien

P L A N

A DISTRIBUTION SANGUINE ET TISSULAIRE DE LA QUINIDINE

1. TRAVAUX ANTERIEURS

- 1.1. Absorption et formes circulantes de la quinidine
- 1.2. Taux sanguins après administration de quinidine
- 1.3. Elimination urinaire de la quinidine
- 1.4. Intérêt de la détermination de la quinidinémie
- 1.5. Distribution tissulaire de la quinidine

2. TRAVAUX PERSONNELS

- 2.1. Evolution sanguine et tissulaire des taux de quinidine chez le Chien, après une injection veineuse de 10 mg/kg de poids
 - 2.1.1. Technique
 - 2.1.2. Résultats
 - 2.1.2.1. Evolution des taux sanguins
 - 2.1.2.2. Répartition tissulaire
 - 2.1.2.3. Cinétique de la fixation tissulaire
- 2.2. Evolution sanguine et tissulaire des taux de quinidine chez le Chien, après une injection veineuse de 50 mg/kg de poids
 - 2.2.1. Technique
 - 2.2.2. Résultats
 - 2.2.2.1. Evolution des taux sanguins
 - 2.2.2.2. Répartition tissulaire
 - 2.2.2.3. Cinétique de la fixation tissulaire

2.3. Discussion

3. CONCLUSION

B LIAISON DE LA QUINIDINE AUX PROTEINES SERIQUES DU CHIEN - ETUDE PAR FILTRATION SUR GEL ET PAR ELECTROPHORESE SUR PAPIER

1. INTRODUCTION - TRAVAUX ANTERIEURS

2. TRAVAUX PERSONNELS

2.1. Etude de la liaison protéinique de la quinidine par filtration sur gel de séphadex

2.1.1. La filtration sur gel de séphadex : généralités et principe

2.1.2. Méthode

2.1.3. Résultats

2.1.4. Discussion

2.2. Etude de la liaison protéinique de la quinidine par électrophorèse sur papier

2.2.1. Principe

2.2.2. Méthode

2.2.3. Résultats

2.2.4. Discussion

3. CONCLUSIONS

C METABOLITES URINAIRES DE LA QUINIDINE

1. TRAVAUX ANTERIEURS

2. TRAVAUX PERSONNELS

2.1. Recueil des urines destinées à l'étude de métabolisme

2.2. Extraction par un solvant organique, avant et après hydrolyse enzymatique, des métabolites urinaires de la quinidine

2.2.1. Principe

2.2.2. Méthode

2.2.3. Résultats

2.3. Isolement chromatographique de la quinidine et de ses métabolites urinaires, sur Sephadex G-10

2.3.1. Principe de l'utilisation des Sephadex G-10

2.3.2. Matériel et méthode

2.3.3. Résultats

2.3.3.1. Pouvoir d'adsorption des Sephadex vis-à-vis de la quinidine en solution aqueuse

2.3.3.2. Pouvoir d'adsorption des Sephadex vis-à-vis de la quinidine en solution dans l'urine

2.3.3.3. Protocole sur Sephadex appliqué à l'étude du métabolisme urinaire de la quinidine

2.4. Discussion

3. CONCLUSION

La quinidine et la quinine présentent de grandes analogies structurales, métaboliques et pharmacologiques ; ceci a incité certains auteurs à étendre à la quinidine les conclusions des travaux concernant la quinine. Il en résulte une grande confusion.

D'autre part, il est souvent difficile de comparer les résultats obtenus par les auteurs, les uns utilisant pour le dosage de la quinidine dans les milieux biologiques, des méthodes par extraction, les autres par précipitation. Or nous avons vu que les résultats pouvaient être très différents selon la méthode employée.

Enfin, la pureté chimique de l'alcaloïde utilisé au cours des études métaboliques, n'a été, en aucun cas, testée. Or SUSZKO (45) a montré par chromatographie en couches minces que la quinidine commerciale pouvait être souillée par sa base dihydrogénée. Ainsi certains composés isolés et considérés comme des métabolites de la quinidine ne sont peut-être en fait que des impuretés.

Précisons pour terminer, que les publications antérieures à 1941 n'ont pas été prises en considération, car elles font appel à des techniques par trop archaïques .

A. DISTRIBUTION SANGUINE ET TISSULAIRE DE LA QUINIDINE

1. TRAVAUX ANTERIEURS

1.1. Absorption et formes circulantes de la quinidine

L'absorption digestive de la quinidine administrée par voie orale est rapide et totale :

- rapide, puisqu'elle est présente dans le sang dès la 15ème minute (46, 47)
- totale, car l'élimination fécale représente moins de 5 % de la dose ingérée (48, 49) .

Une faible acidité gastrique facilite en outre l'absorption, MANKIN (50) ayant constaté que des sujets achlorhydriques présentaient des concentrations plasmatiques supérieures à celles de sujets normaux ; mais la différence n'est pas significative .

La quinidine plasmatique serait liée à 80 % aux albumines, à l'exclusion de toute autre fraction protéique ; chaque molécule d'albumine possède un site récepteur et la constante de dissociation de la liaison albumine-quinidine est de $1,3 \times 10^{-4}$ à un pH de 7,4. La quinidine se fixe également sur l'hémoglobine du globule rouge où elle pénètre rapidement. Ces résultats ont été obtenus par CONN, en faisant appel à des méthodes, telles la dialyse équilibrée (voir p. 93) .

1.2. Taux sanguins après administration de quinidine

Après administration orale d'une dose unique, la quinidinémie atteint un maximum entre la 1ère et la 4ème heure (46,47,49,51-54), maximum suivi d'une décroissance relativement rapide (46) :

à la 6ème heure, la chute atteint 20 à 40 % ,
à la 8ème heure, elle est de 40 à 60 % ,
à la 12ème heure, 60 % au moins a disparu,
et à la 24ème heure, la chute est de 90 % .

D'autre part, tous les auteurs (46,49,52,54,55-57) s'accordent pour affirmer que les courbes représentant la quinidinémie sont très variables pour une dose identique de quinidine : d'un individu à l'autre, et d'un jour à l'autre chez le même individu .

BROWN (53) et SWISHER (58), indépendamment l'un de l'autre, ont comparé les taux sanguins chez des sujets sains, hépatiques (cirrhoses et hépatites), "rénaux" (urée supérieure à 1,40 g/litre) et cardiaques, après absorption de 1,60 g de quinidine en 4 fois.

Ces quatre groupes présentent le même maximum, mais chez les cardiaques, la décroissance plasmatique est nettement plus lente : 26 heures après absorption de la dernière prise, les 3 premiers groupes voient leur quinidinémie diminuer de 65 % alors que chez les cardiaques, la chute atteint seulement 50 %, ce qui est hautement significatif. Et au bout de 50 heures, les concentrations plasmatiques sont dix fois plus élevées chez les cardiaques.

Ces résultats, confirmés par LINDSETH-DITLEFSEN (59), montrent qu'une importante atteinte rénale ou hépatique n'a aucune incidence sur les taux sanguins, alors que le muscle cardiaque hypertrophié fixerait plus de quinidine, qu'il relâcherait lentement.

La quinidine pouvant donner lieu à des signes d'intolérance gastrique, certains ont pensé utiliser les voies rectale et I.M. et ont été amenés à les comparer à la voie orale. Cette comparaison se base sur les taux sanguins obtenus après administration d'une même dose de quinidine.

Par voie orale et I.M., KALMANSOHN (51) trouve que les maximums surviennent sensiblement aux mêmes temps et aux mêmes taux ; par contre, la décroissance est plus lente par voie I.M. .

Quant à la voie rectale, elle n'offre que peu d'intérêt : l'absorption est lente, partielle ; aussi le pic de la quinidinémie survient tardivement et présente peu d'importance.

Le tableau ci-dessous illustre ces constatations :

Voie d'administration	Orale	I.M.	Rectale
Quinidine administrée	0,60 g	0,60 g	0,60 g
Quinidinémie maximum	3,20 μ g/ml	2,70 μ g/ml	0,89 μ g/ml
Maximum atteint après ...	2h 15	2h 20	3h 15
% de chute après 4 heures	4 à 45 %	6 à 29 %	-
" " " 8 heures	27 à 58 %	17 à 55 %	20 à 60 %
" " " 12 heures	-	-	proche de 100 %
" " " 24 heures	78 à 100 %	72 à 90 %	100 %

Ces résultats sont confirmés par LINDSETH-DITLEFSEN (52)

1.3. Elimination urinaire de la quinidine

Selon HOUSTON (49), si l'élimination urinaire par 24 heures peut atteindre 30 % de la dose administrée, elle est plus généralement inférieure à 10 % (23 cas sur 26) .

Par contre, SOKOLOW (55) relève des éliminations un peu supérieures :

4,8 % de la dose administrée, pendant les 12 premières heures (moyenne établie d'après 14 cas).

10,1 % de la dose administrée en une seule fois, pendant les 24 premières heures (7 cas) .

15,5 % de la dose administrée lors d'un traitement au long cours (12 cas) .

Cette élimination urinaire est, d'après MICHEL (60), plus faible chez les personnes âgées.

1.4. Intérêt de la détermination de la quinidinémie

L'intérêt de la détermination de la quinidine circulante au cours du traitement de la fibrillation auriculaire est controversé car l'importance de l'effet cardiaque n'est pas en accord, selon WEGRIA (61), avec la quinidinémie, celle-ci diminuant plus rapidement que l'intensité de l'action sur le coeur. WEISMAN (62) considère même que l'utilisation de la quinidinémie comme base de la conduite du traitement est dangereuse.

D'autre part, la réduction de la fibrillation auriculaire survient pour des taux très variables, comme le souligne la plupart des statistiques publiées :

SOKOLOW (55,63) a obtenu la conversion de la fibrillation dans 82 % des cas avec une quinidinémie moyenne de 5,9 $\mu\text{g/ml}$ et 71 % de ces succès l'ont été pour

des taux inférieurs à 7 $\mu\text{g/ml}$. Il enregistre d'autre part 50 % d'échecs pour des taux supérieurs à 8 $\mu\text{g/ml}$.

BARBIER (54) note que le pic moyen de réduction est de l'ordre de 3 $\mu\text{g/ml}$, la "fourchette" des taux efficaces étant très large : de 0,54 (?) à 9,85 $\mu\text{g/ml}$.

MOUQUIN (56) présente une statistique plus proche de celle de SOKOLOW. Il obtient lui aussi 80 % de succès ; le taux moyen efficace est de 4,5 $\mu\text{g/ml}$ avec des quinidinémies s'étalant de 1,8 à 7,4 $\mu\text{g/ml}$. Des taux supérieurs à 8 $\mu\text{g/ml}$ ne lui ont apporté aucun succès thérapeutique.

Il faut en outre préciser que chez le même individu, la réduction de la fibrillation n'est pas toujours obtenue, tant s'en faut, avec des concentrations sanguines voisines.

Par contre, l'intérêt du dosage s'affirme pour éviter les signes de toxicité myocardique qui surviennent rarement pour des taux inférieurs à 6 $\mu\text{g/ml}$: 1,6 % des cas traités présentait des signes toxiques pour une quinidinémie inférieure à 6 $\mu\text{g/ml}$, 12 % de 6 à 8 $\mu\text{g/ml}$, 30 % entre 8 et 10 $\mu\text{g/ml}$ (63).

D'ailleurs, peu de bons résultats sont enregistrés à des taux supérieurs à 8 $\mu\text{g/ml}$: CONN (64) signale tout de même un cas où la concentration sanguine de 20 $\mu\text{g/ml}$ était très bien supportée et était nécessaire pour obtenir un effet thérapeutique.

En conclusion, la détermination de la quinidinémie n'est pas très précieuse comme juge du traitement car elle n'est pas en corrélation étroite ni avec la dose administrée ni avec l'effet thérapeutique.

Malgré ceci, on peut affirmer que les meilleurs résultats sont obtenus pour des taux compris entre 4 et 8 $\mu\text{g/ml}$ et que des taux inférieurs à 2 $\mu\text{g/ml}$ sont rarement bénéfiques. Enfin, les accidents cardiaques en cours de traitement surviennent peu fréquemment à des concentrations inférieures à 7 $\mu\text{g/ml}$.

Mais l'apparition de quinidines à action prolongée (65-68) et tout récemment d'une véritable quinidine-retard (Arabogalactane sulfate de quinidine - ND Longacor) (69,70) offre une maniabilité très intéressante et une meilleure efficacité, en mettant les malades à l'abri de brusques variations de la quinidinémie.

1.5. Distribution tissulaire de la quinidine

La distribution tissulaire de la quinidine a été peu étudiée : seules quelques publications fragmentaires, pour la plupart antérieures à 1950, en font mention.

Les travaux de HIATT (71) d'une part, de KELSEY (72) d'autre part, ont montré que la quinidine se retrouve à des concentrations supérieures à celles du plasma dans les tissus, quelle que soit l'espèce animale à laquelle on s'adresse. Foie, poumons, reins, rate en fixent chez le Chien, les plus grandes quantités tandis que cerveau, muscle, bile, L.C.R. sont très pauvres.

Quelques chiffres puisés dans les travaux de HIATT et QUINN illustrent ces données. Ils ont été obtenus chez le chien après une perfusion I.V. continue :

	<u>CHIEN n° 1</u>	<u>CHIEN n° 2</u>
Plasma	3 μ g/ml	3,5 μ g/ml
Globules rouges	3,3 "	11,5 "
L.C.R.	0,9 "	1 "
Bile	6 "	16,8 "
Cerveau	1,8 μ g/g	6,6 μ g/g
Muscle	3,9 "	10,5 "
Rate	59,4 "	79,5 "
Rein	60 "	63 "
Foie	117 "	59,5 "
Poumons	75 "	51,5 "

KELSEY constate en outre des différences parfois marquées d'activité métabolique entre le rat, le lapin et divers oiseaux. Il insiste d'autre part sur le fait que les globules - rouges et blancs - contiennent plus de quinidine que le plasma. Ceci doit être rapproché des travaux de CONN (64) qui observe une pénétration rapide de la quinidine dans les globules rouges.

WEGRIA et BOYLE (61) ont étudié pour leur part, sur quelques chiens recevant 50 mg/kg de quinidine la décroissance des taux dans le plasma, le muscle, le rein, le ventricule et l'oreillette.

Les concentrations maximales sont atteintes en moins de 3 heures ; 6 heures après l'ingestion, les auteurs observent une chute importante des taux tissulaires, chute qui est dans les heures suivantes beaucoup plus lente. Les résultats ont été obtenus en sacrifiant les animaux 3, 6, 10 et 14 heures après ingestion de la drogue :

	PLASMA /ug/ml	MUSCLE /ug/ g	REIN /ug/g	VENTRICULE /ug/ g	OREILLETTE /ug/ g
Chien témoin	0	1,1	4,4	4,4	4,5
Chiens sacrifiés					
3h après	12,5	60	148,4	148,6	104,1
6h "	5,2	20,7	62,5	31,8	27,2
10h "	3,2	25,3	56,9	45,9	32,9
14h "	2,4	14,8	37,4	23	17,7

Il faut insister sur la valeur élevée des "blancs" organes.

Quant à ARORA (73), il s'est plus spécialement attaché à la répartition de la quinidine dans les différentes chambres cardiaques. Il constate, chez le Chien, après administration de 15 mg/kg, que la distribution n'est pas uniforme, les concentrations étant plus élevées dans le ventricule que dans l'oreillette :

Ventricule gauche	26,5	/ug/ g
" droit	23,1	"
Oreillette gauche	14,3	"
" droite	14,1	"

Il envisage également la répartition intracellulaire cardiaque et hépatique (73,74) .

2. TRAVAUX PERSONNELS

Nous avons étudié, chez le Chien, à doses thérapeutiques et à doses toxiques, l'évolution sanguine et tissulaire des taux de quinidine après une injection veineuse. La répartition dans l'organisme de cet alcaloïde a été également précisée.

D'autre part, il nous a paru utile de suivre concurremment l'évolution des concentrations de quinidine dans le plasma et le coeur, afin d'établir s'il existe un rapport constant entre celles-ci. Ainsi, aborde-t-on le problème de la signification de la quinidinémie.

Enfin, nous avons examiné si des modalités particulières de fixation par chacune des parties d'un même organe comme le coeur, ne pouvaient pas rendre compte de caractéristiques d'action.

2.1. Evolution sanguine et tissulaire des taux de quinidine, chez le Chien, après une injection veineuse de 10 mg/kg de poids

2.1.1. Technique

Chez 7 chiens anesthésiés au penthiobarbital sodique, sont réalisées des injections I.V. lentes (10 minutes) de sulfate de quinidine en solution très faiblement sulfurique, qui correspondent à 10 mg de quinidine-base par kg de poids.

Des dosages sanguins - plasmatique et érythrocytaire - ont été effectués, en règle générale, en fin d'injection et 5, 15, 45 mn, 2, 4, 6, 8h après arrêt de celle-ci ; 2 chiens ont dû cependant être sacrifiés à la 6ème heure et même 2 autres, dès la 2ème heure.

Aux temps précédents, des biopsies de foie et de muscle du squelette ont été pratiquées, et en cours d'expériences, à certains temps, des fragments d'auricule ont également été prélevés. En ce qui concerne les prélèvements hépatique et musculaire, il n'y a aucune difficulté : les fragments nécessaires au dosage sont détachés du lobe hépatique gauche et de muscles de la cuisse au bistouri électrique. Pour le coeur où le problème est plus délicat, sont excisées, à partir de la pointe, de petites portions de l'auricule droite fermée en bourse de plus en plus près de sa base par un fil passé dans l'épaisseur de sa paroi (75) .

Enfin, 2, 6 ou 8h après la fin de l'injection, les chiens sont autopsiés et des prélèvements sont effectués sur la majorité des organes et même sur les différentes parties du coeur.

2.1.2. Résultats

2.1.2.1. Evolution des taux sanguins

D'un chien à l'autre, les concentrations plasmatiques et globulaires, aux différents temps de prélèvement, sont très cohérentes, comme le soulignent les

figures 1 et 2, figures établies d'après les résultats consignés dans les deux premiers tableaux .

Le taux plasmatique moyen qui atteint 7,50 $\mu\text{g/ml}$ en fin de perfusion chute brutalement puisqu'à la 15ème minute, il n'est plus que de 3,95 $\mu\text{g/ml}$. La chute, ralentie de la 15ème à la 45ème minute, devient par la suite extrêmement faible : les taux passent de 2,55 $\mu\text{g/ml}$ à la 2ème heure à 2,15 $\mu\text{g/ml}$ à la 8ème.

Quant aux taux globulaires, sensiblement plus homogènes, ils subissent une évolution analogue mais plus marquée ; presque toujours supérieurs aux taux plasmatiques en fin d'injection (taux moyen : 10,2 $\mu\text{g/ml}$), ils présentent une décroissance très importante jusqu'à la 45ème minute, le taux moyen n'étant plus alors que de 1,90 $\mu\text{g/ml}$. La chute est ensuite beaucoup plus lente et 8 heures après l'injection, le taux globulaire moyen est de 1 $\mu\text{g/ml}$, ce qui est nettement inférieur au taux plasmatique correspondant (2,15 $\mu\text{g/ml}$) .

Dans le tableau ci-dessous, se trouve portée la variation du rapport quinidine globulaire en fonction du temps. Ce rapport s'inverse dès la 5ème minute, diminue jusqu'à la 2ème heure et se stabilise ensuite autour de 0,50 .

	Rapport érythro-plasmatique
Fin de l'injection	1,36
5 mn après	0,99
15 mn après	0,76
45 mn "	0,61
2 h "	0,49
4 h "	0,52
6 h "	0,55
8 h "	0,47

Dosage de QUINIDINE PLASMATIQUE chez des chiens ayant reçu par V.I.V. 10 mg/kg en 10 minutes

CHIENS	A	B	C	D	E	F	G	Moyenne (M)
Fin de l'injection	7,1	9,6	5	5,7	7,5	9,75	7,8	7,50
5 mn après	5,4	8,2	10' 3,8	4,2	4,1	6,4	3,5	5,15
15 mn après	3,5	7		3,4	3,5	-	2,3	3,95
45 mn après	2,5	6	2,35	2,5	2,5	4,2	1,75	3,10
2h après	2,1	4,8	1,9	2	2	3,8	1,35	2,55
4h après	2,1	5,2	1,6	1,7	1,35	-	-	2,40
6h après	2,2	4,4	0,95	1,4	1,7	-	-	2,15
8h après	1,7	3,7	1	-	-	-	-	2,15

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/ml}$ de plasma.

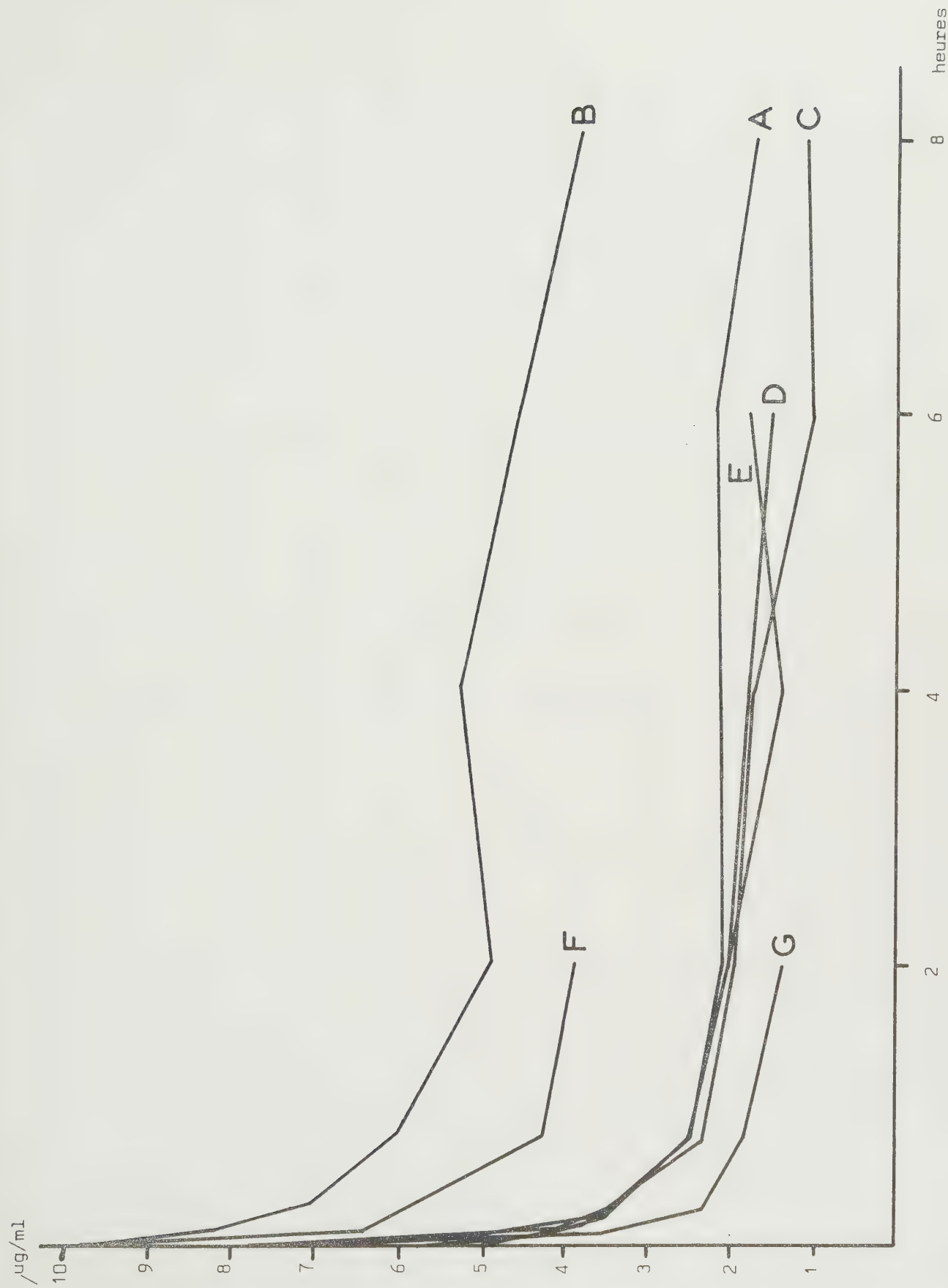


Fig. 1 Décroissance plasmatique de la quinidine après administration I.V. de 10 mg/kg .

TABLEAU II

Dosage de QUINIDINE GLOBULAIRE chez des chiens ayant reçu par V.I.V. 10 mg/kg en 10 minutes

CHIENS	A	B	C	D	E	F	G	Moyenne (M)
Fin de l'injection	11,5	8,2	6,8	7,6	11,8	12,65	13	10,20
5 mn après	7,7	4,8	10' 4,1	4,2	4,2	4,5	4,8	5,1
15 mn après	4	3,6		2,75	2,65	-	1,95	3
45 mn après	2,5	2,9	2,5	1,75	1,3	1,5	0,9	1,9
2h après	1,3	2,1	1,55	1,2	0,9	1	0,45	1,25
4h après	1,3	2,1	1,20	0,9	0,8	-	-	1,25
6h après	1,7	1,5	1	0,85	1	-	-	1,20
8h après	1	1,3	0,75	-	-	-	-	1

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/ml}$ de globules rouges.

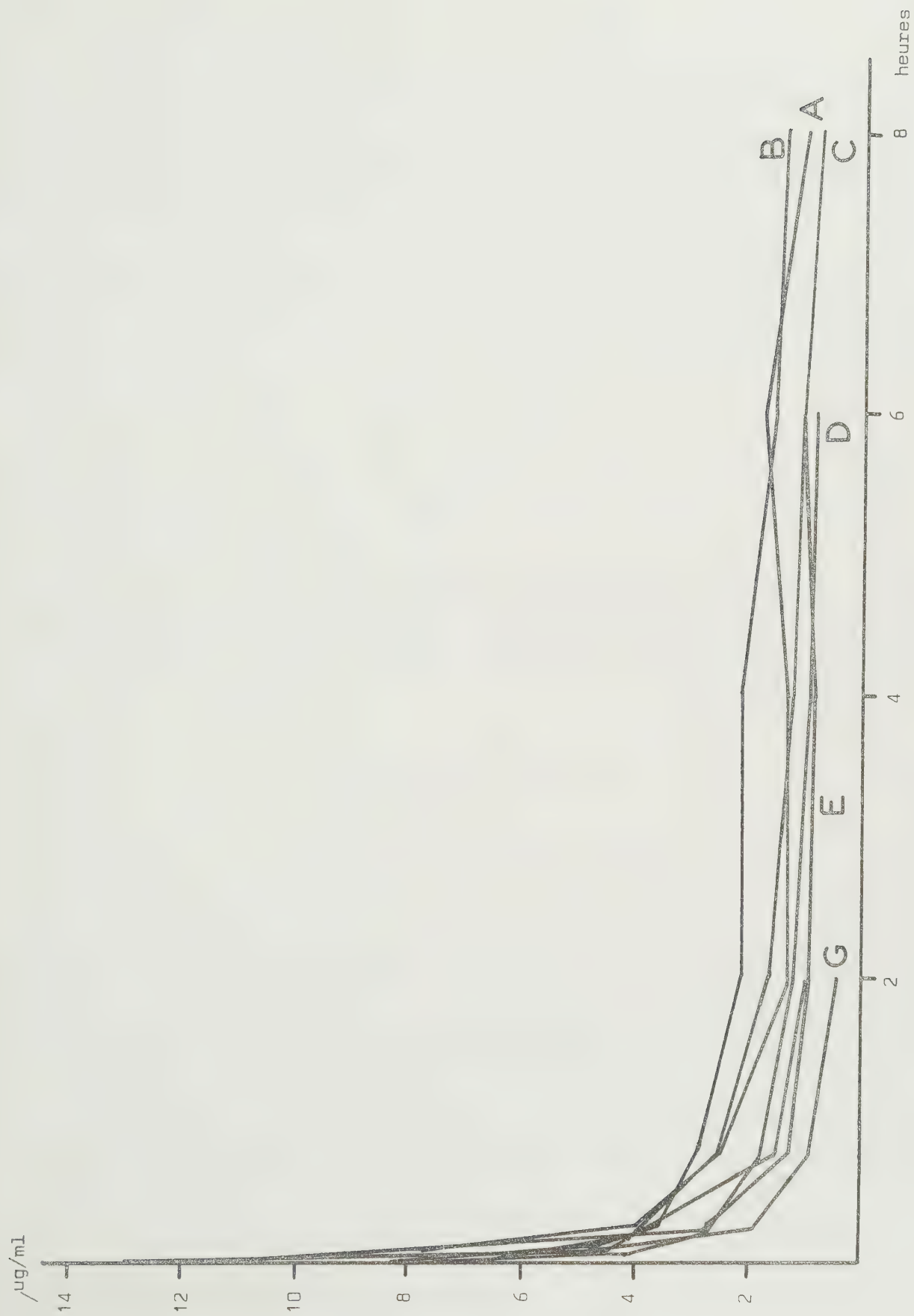


Fig. 2 Décroissance globale de la quinidine après administration I.V. de 10 mg/kg .

2.1.2.2. Répartition tissulaire de la quinidine

La décroissance des taux sanguins de la quinidine s'explique par le fait que la fixation tissulaire est importante comme le montre le tableau III où sont portés les résultats de nos dosages. Ce tableau est complété par la figure 3 .

Les organes ont été prélevés 8 heures après la fin de l'injection sur les chiens A, B, C, 6 heures après sur les chiens D et E, 2 heures après sur les chiens F et G . La moyenne des taux tissulaires a été obtenue d'après les dosages réalisés sur les chiens A, B, C, D, E .

Nous retrouvons les concentrations les plus élevées dans les poumons (taux moyen 22,5 $\mu\text{g/g}$), dans les reins (12,5 $\mu\text{g/g}$), le foie (10,85 $\mu\text{g/g}$) et la rate (8,3 $\mu\text{g/g}$) ; dans ces organes, les concentrations sont de 4 à 10 fois supérieures à celles du plasma.

Par contre, le muscle fixe beaucoup moins de quinidine ; mais si les muscles du squelette et le diaphragme, muscle strié actif, en renferment des quantités semblables, il n'en est pas de même du muscle cardiaque qui retient presque deux fois plus de quinidine :

Muscle strié du squelette	2,15 $\mu\text{g/g}$
Ventricule	4,25 "
Oreillette	3,75 "
Auricule	3,75 "

Remarquons que le ventricule, l'oreillette et l'auricule se comportent de façon identique ; nous pouvons donc considérer les taux de l'auricule comme le reflet fidèle des taux cardiaques. En outre, aucun écart significatif n'a été découvert entre les teneurs des parois des cavités homologues droite et gauche.

Enfin, les parties riches en lipides - cerveau, graisse - ne renferment que peu de quinidine ; elles présentent en effet des concentrations généralement inférieures à 1 $\mu\text{g/g}$.

TABLEAU III

REPARTITION TISSULAIRE de la quinidine chez des chiens ayant reçu par V.I.V. 10 mg/kg en 10 minutes

CHIENS	A	B	C	D	E	F	G	Moyenne (M)
POUMONS	34	20	24,5	18,5	15,5	27,5	18,3	22,5
REINS	10	9,5	17,5	12,5	13	15,5	9,6	12,5
FOIE	9,7	10	12	11	11,5	11	-	10,85
RATE	4,5	8	9	9	11	21	8,7	8,3
VENTRICULE DROIT	2,9	4,1	3,2	5,9	5,3	6,1	9,9	4,3
VENTRICULE GAUCHE	3,3	3,9	2,9	5,5	5,3	6,2	8	4,2
OREILLETTE DROITE	2,9	2,9	2,8	5,3	5,7	4,4	6,6	3,9
OREILLETTE GAUCHE	3,4	2,7	3,1	4,1	4,8	5,5	6,2	3,6
AURICULE	3	3,4	2,8	4,5	5	5,2	4,9	3,75
MUSCLE	2,1	1,8	1,7	2,3	2,9	3,9	3,4	2,15
CERVEAU	0,2	0,2	0,4	0,7	0,8	1,3	1,6	0,45
GRAISSE	0,2	0,6	0,8	0,8	1	0,9	0,8	0,70

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ d'organe.

Les prélèvements ont été effectués 8 heures après la fin de l'injection sur les chiens A, B, C, 6 heures après sur les chiens D et E, 2 heures après sur les chiens F et G. La moyenne a été obtenue d'après les dosages réalisés sur les chiens A, B, C, D, E.

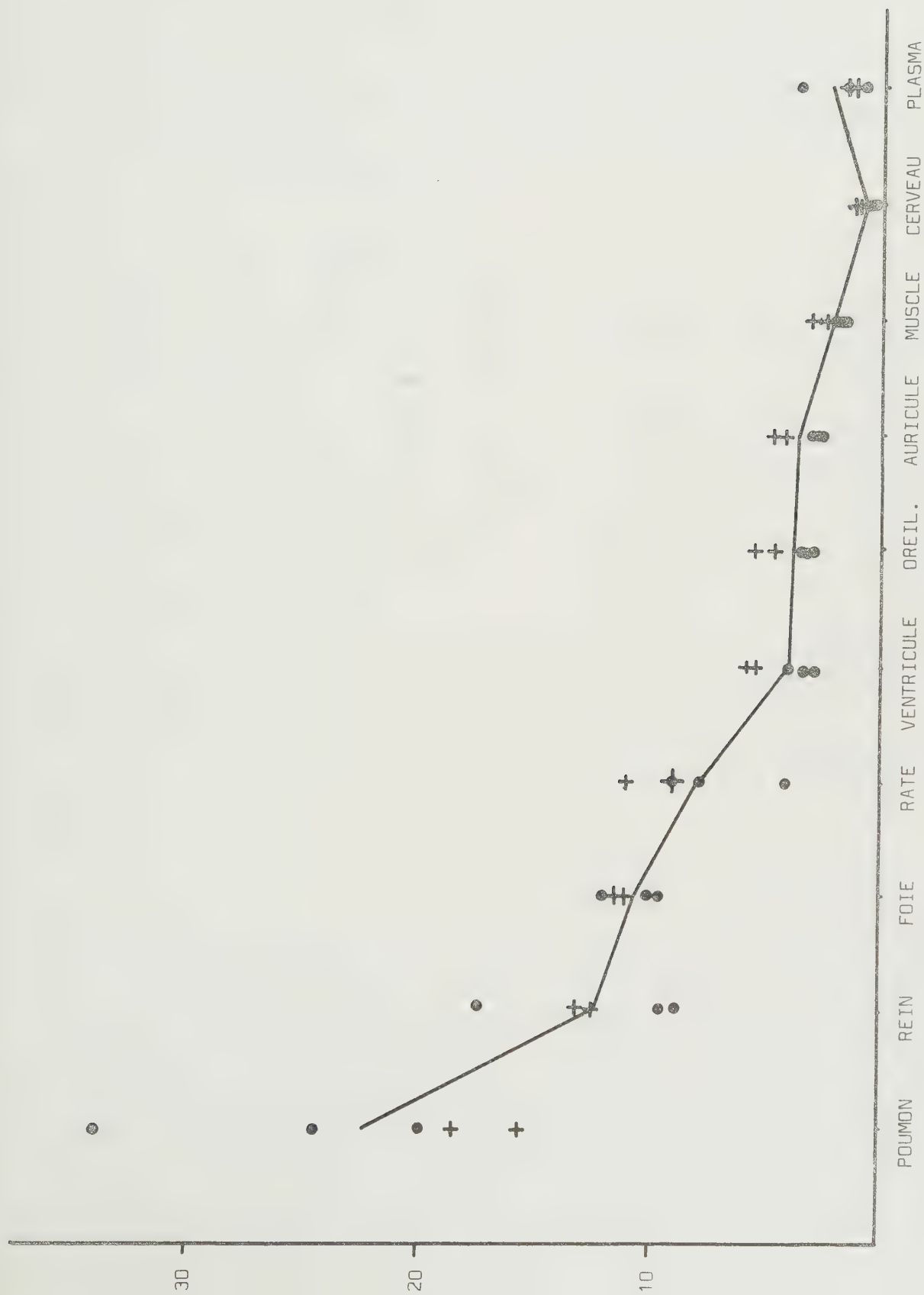


Fig. 3 Répartition de la quinidine dans différents tissus, chez des chiens ayant reçu par V.I.V. 10 mg de quinidine par kg de poids.

● Prélèvements effectués 8 heures après la fin de l'injection
 + Prélèvements effectués 6 heures après la fin de l'injection
 — Répartition moyenne

2.1.2.3. Cinétique de la fixation tissulaire

Nous avons étudié la cinétique de la fixation tissulaire de la quinidine en effectuant des biopsies de foie, de muscle et d'auricule à différents moments après l'injection de la drogue.

. Cinétique hépatique

L'évolution de la concentration hépatique de quinidine, dont l'allure générale - décroissance abrupte puis ralentie - rappelle celle que nous avons observée au niveau du sang, mérite cependant deux précisions :

- La régression du taux hépatique, différée de quelques minutes, puisque nous avons même constaté une élévation dans les 5 premières minutes chez un chien, est presque aussi rapide que celle du taux plasmatique : la teneur passe en effet à 78 % de sa valeur initiale à la 15ème minute, à 45 % à la 2ème heure, à 31 % enfin à la 8ème heure.

- Les concentrations observées dans le foie sont toujours très largement supérieures à celles du plasma, le foie contenant 4,6 fois plus de quinidine que le plasma à la fin de l'injection et 4,9 fois plus 8h plus tard.

Nos résultats consignés dans le tableau IV sont explicités par la figure 4 .

. Fixation de la quinidine par le muscle du squelette

Le muscle strié s'individualise par une fixation lente de la quinidine (tableau et figure 5) alors que la concentration musculaire à la fin de l'injection est légèrement inférieure à celle du plasma (81 %) ; elle la dépasse ensuite, car le taux musculaire maximum ne survient qu'à la 15ème ou à la 45ème minute, les taux plasmatiques étant alors ramenés à 54 et 41 % de leur valeur initiale. Ultérieurement, la diminution de la quinidine intra-musculaire se fait de façon lente et progressive.

Remarquons sur la figure 5 que si les taux musculaires sont disparates avant la 2ème heure, par la suite ils sont très voisins.

. Cinétique de la fixation cardiaque

Les biopsies de l'auricule permettent de suivre la fixation cardiaque comme nous l'avons vu précédemment.

Nous constatons sur le tableau V et la figure 5bis que les concentrations cardiaques sont pratiquement toujours supérieures, souvent très nettement - de 2 à 7 fois - aux concentrations du muscle du squelette. Cette fixation massive est en outre précoce, les taux maximums étant atteints dès la 5ème minute. Quant à la décroissance, elle semble rapide mais nos résultats peu nombreux ne nous permettent pas de conclure.

Il faut noter que le rapport entre les concentrations auriculaire et plasmatique varie d'une manière importante, de 0,92 à 8,28 .

FIXATION HEPATIQUE de la quinidine chez des chiens ayant reçu par V.I.V. 10 mg/kg en 10 minutes

CHIENS	A	B	C	D	E	F	G	Moyenne (M)
Fin de l'injection	<u>49</u>	<u>35</u>	<u>52</u>	<u>42</u>	16,5	<u>28</u>	<u>19,5</u>	34,55
5 mn après	46	35	10' 50,5	35	18,5	-	-	<u>37,1</u>
15 mn après	33	30		31	<u>30,5</u>	-	10,5	27
45 mn après	20	25	28	23	24,5	17,5	12,5	21,5
2h après	11,5	17	22,5	-	15	11	-	15,4
4h après	10,7	14	18,5	11	14	-	-	13,65
6h après	10	-	10,5	11	11,5	-	-	10,75
8h après	9,7	10	12	-	-	-	-	10,55

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ d'organe.

Les chiffres soulignés correspondent au taux hépatique maximum .

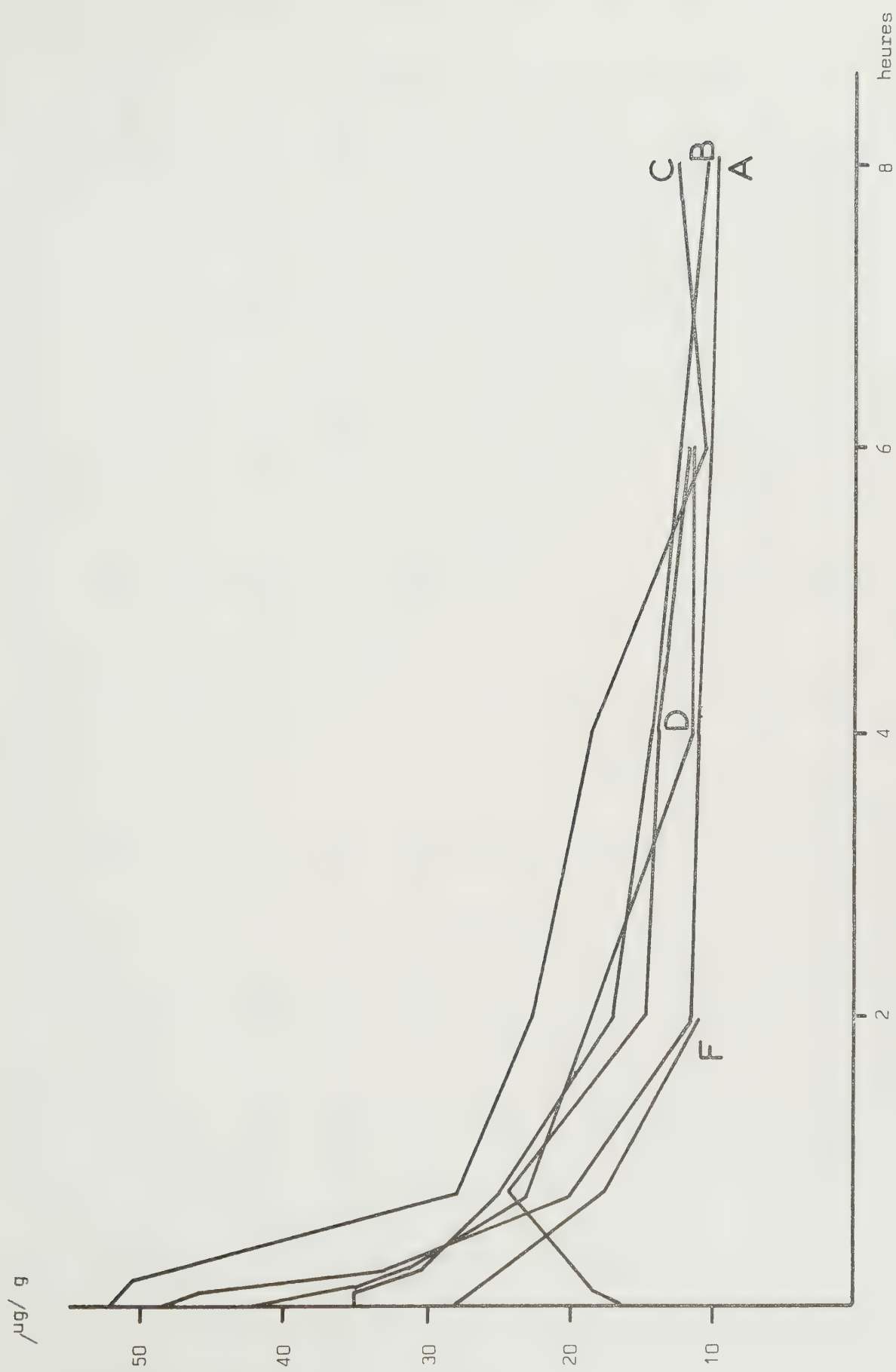


Fig. 4 Fixation hépatique de la quinidine après administration I.V. de 10 mg/kg .

Fixation par le MUSCLE STRIE de la quinidine chez des chiens ayant reçu par V.I.V. 10 mg/kg en 10 minutes

CHIENS	A	B	C	D	E	F	G	Moyenne (M)
Fin de l'injection	1,7	4,9	<u>14,5</u>	10,7	4,6	3,5	2,4	6,05
5 mn après	3,6	3,5	10' 12,5	10,5	8,8	4,5 22,5	3,3 25,9	6,80 24,2
15 mn après	4,1	4,5		<u>10,8</u>	<u>13</u>	-	<u>3,8</u>	<u>7,25</u>
45 mn après	4	<u>6,3</u>	10	4,5 9,4	11,6 10,5	5,4 <u>14,5</u>	3,2 14,5	6,45 12,20
2h après	<u>5,2</u>	4,2	7	3,5 9,4	8,7 7	3,9 5,2	3,4 4,9	5,15 6,20
4h après	4,2	3,3	5	3,7	4,6	-	-	4,15
6h après	2,1	2,7	3	2,3 4,5	2,9 5	-	-	2,60 4,75
8h après	2,1 3	1,8 3,4	1,7 2,8	-	-	-	-	1,85 3,05

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ d'organe. Les chiffres soulignés correspondent au taux musculaire maximum. Les chiffres "noirs et rouges" proviennent de dosages effectués respectivement sur le muscle du squelette et sur l'auricule.

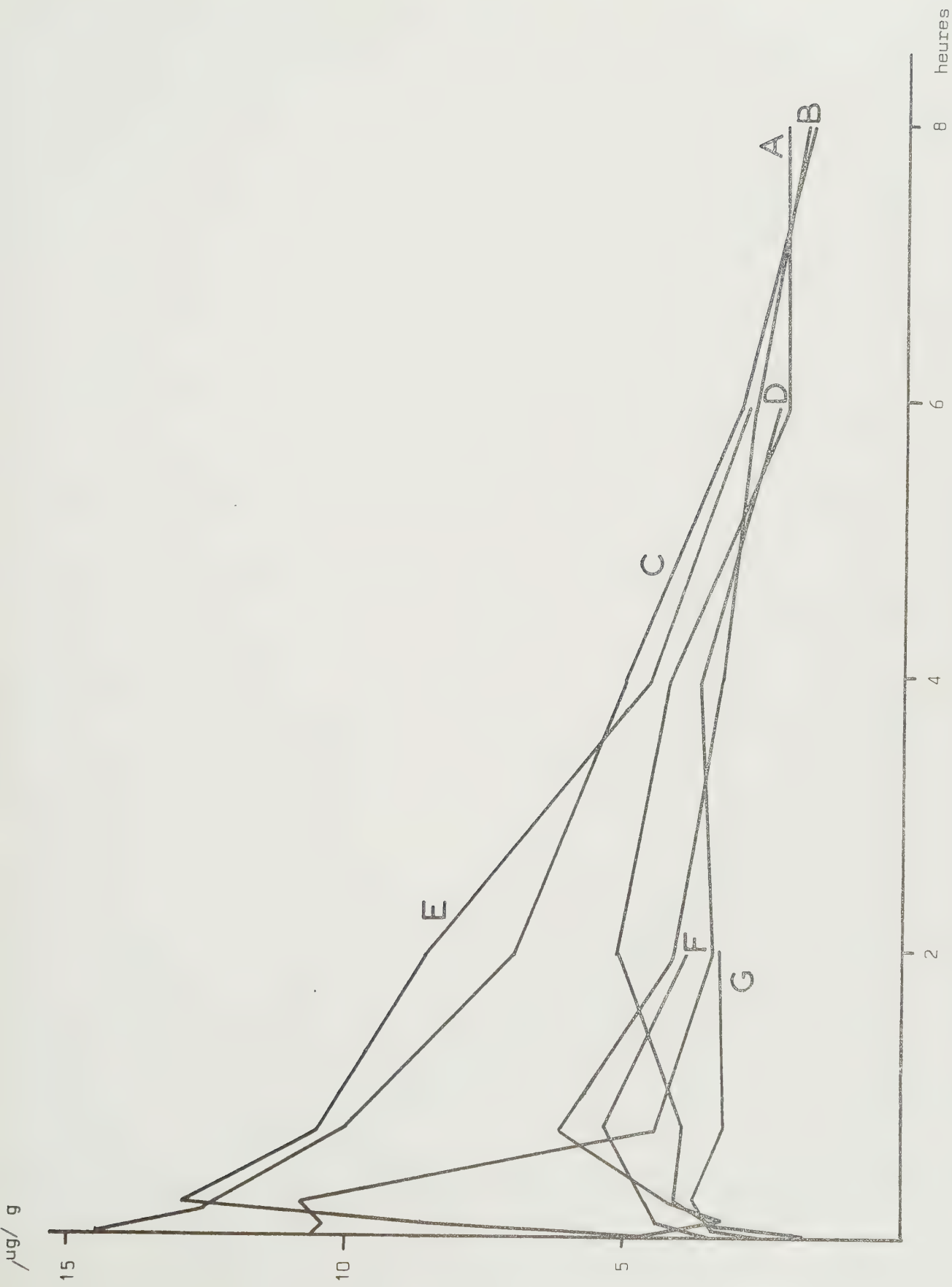


Fig. 5 Fixation par le muscle strié de quinidine après administration I.V. de 10 mg/kg .

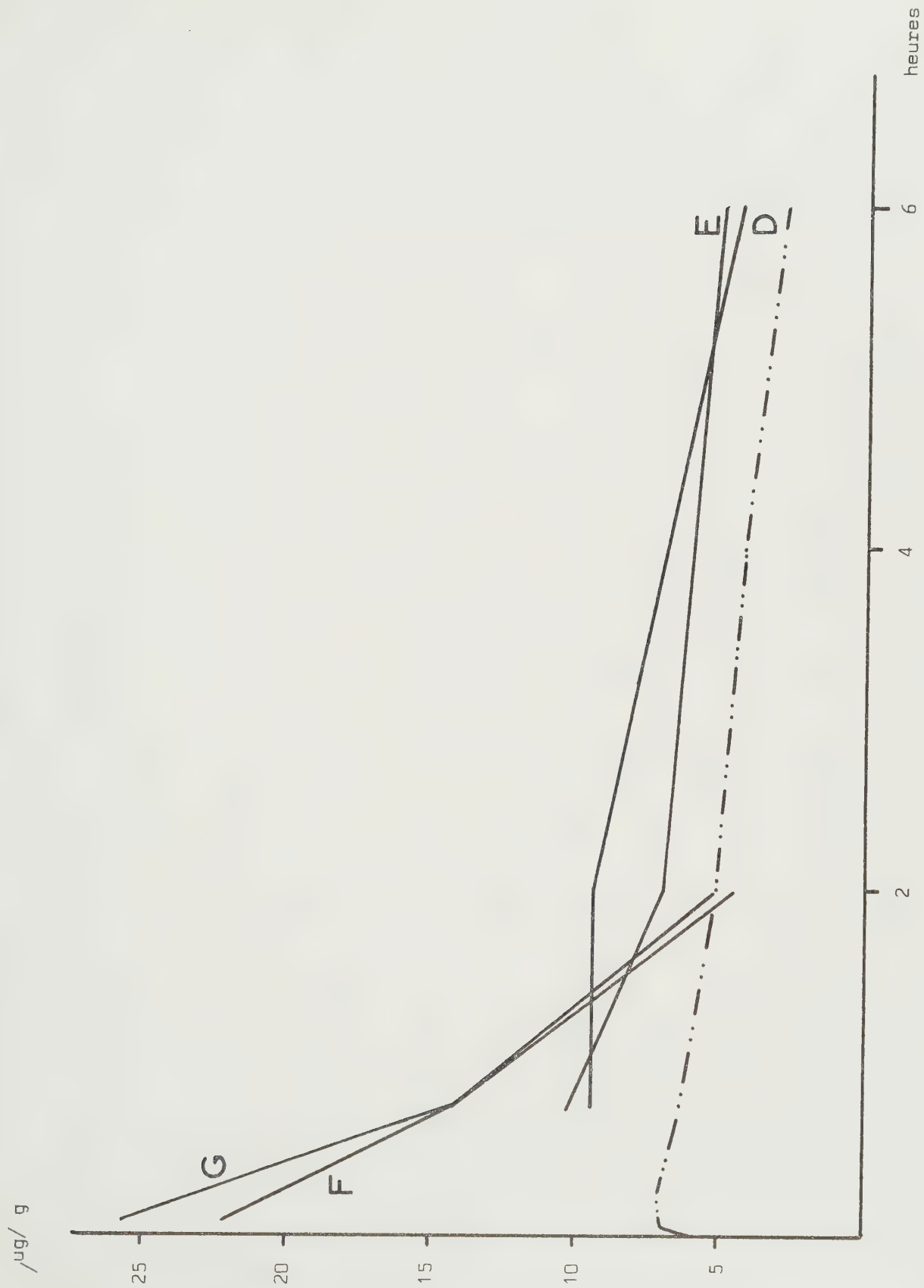


Fig. 5bis Fixation par l'auricule de la quinidine après administration I.V. de 10 mg/kg .

..... Moyenne des taux obtenus sur le muscle strié

TABLEAU VI

Concentrations moyennes de quinidine dans différents milieux et tissus, chez des chiens ayant reçu par V.I.V. 10 mg de quinidine par kg de poids.

	PLASMA	HEMATIES	FOIE	MUSCLE	AURICULE
Fin de l'injection	7,5	10,20	34,55	6,05	-
5 mn après	5,15	5,1	37,1	6,80	24,2
15 mn après	3,95	3	27	7,25	-
45 mn après	3,10	1,90	21,5	6,45	12,2
2 h après	2,55	1,25	15,4	5,15	6,20
4 h après	2,40	1,25	13,65	4,15	-
6 h après	2,15	1,20	10,75	2,60	4,75
8 h après	2,15	1	10,55	1,85	3,05

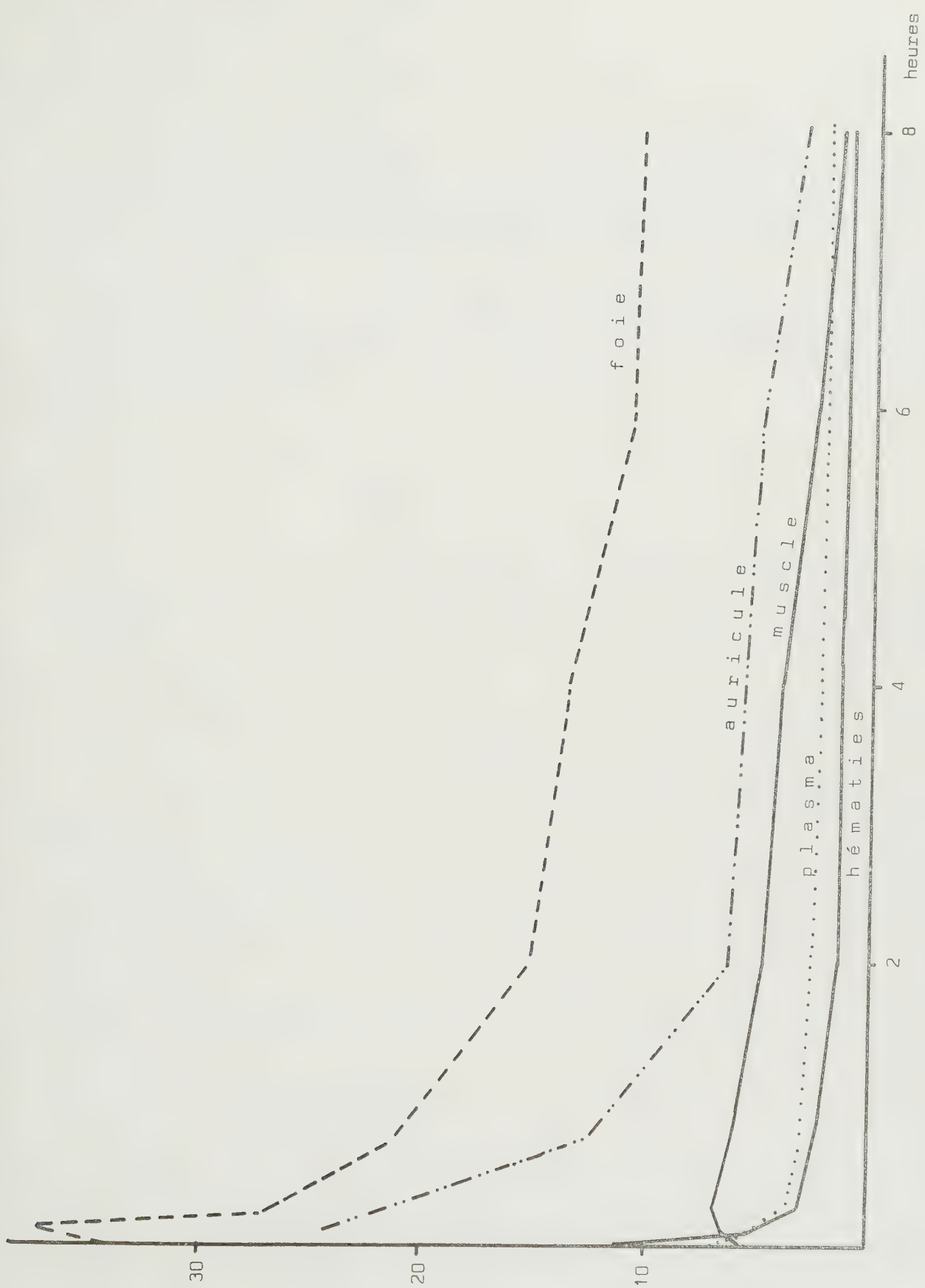


Fig. 6

Evolution moyenne des concentrations de quinidine dans différents tissus et milieux, chez des chiens ayant reçu par V.I.V. 10 mg de quinidine par kg de poids .

2.2. Evolution sanguine et tissulaire des taux de quinidine, chez le Chien, après une injection veineuse de 50 mg/kg de poids

Après avoir étudié les taux sanguins, la répartition dans l'organisme et la cinétique de la fixation tissulaire de la quinidine, chez le Chien, à doses thérapeutiques, nous avons renouvelé la même série d'expériences mais à doses toxiques.

2.2.1. Technique

Un protocole identique à celui décrit précédemment a été utilisé, 50 mg/kg de poids de quinidine-base étant administrés sous la forme de sulfate par voie intraveineuse, à 7 chiens anesthésiés. Afin d'éviter une hypotension accusée et des troubles cardiaques, l'injection a été étalée sur 50 minutes.

L'expérience a été poursuivie pendant 6 heures sur les chiens 1, 2, 3, 4 heures sur les chiens 4 et 5, 2 heures sur les chiens 6 et 7 .

Les prélèvements sanguins ont été effectués en fin de perfusion et 15, 45 minutes, 2, 4, 6 heures après arrêt de celle-ci ; dans le même temps, des biopsies de foie, de muscle du squelette ont été pratiquées. Les fragments d'auricule ont également été prélevés mais plus systématiquement que dans notre première série, pour mieux préciser la cinétique de la fixation cardiaque qui semblait pleine d'intérêt .

Enfin, différents organes ont été prélevés à la 2ème, 4ème ou 6ème heure.

2.2.2. Résultats

2.2.2.1. Evolution des taux sanguins

Les taux globulaire et plasmatique chutent brutalement de la fin de la perfusion à la 15ème minute - respectivement de 65 et de 59 % - plus faiblement

de la 15ème à la 45ème minute, de 29 et 18 %. Par la suite, la décroissance se ralentit et devient régulière. Le taux globulaire moyen passe de 11,7 $\mu\text{g/ml}$ à la 2ème heure à 6,7 à la 6ème, tandis que dans le même temps, le taux plasmatique chute de 9,2 à 4,5 $\mu\text{g/ml}$ (Tableaux I et II ; figures 1 et 2) .

Il faut remarquer que les taux globulaires sont toujours supérieurs aux taux plasmatiques, le rapport $\frac{\text{quinidine globulaire}}{\text{quinidine plasmatique}}$ passant de 2,12 en fin de perfusion à 1,49 à la 6ème heure, ce qui traduit un affaiblissement plus marqué des taux globulaires.

		Rapport érythro-plasmatique
Fin de la perfusion		2,12
15 mn après		1,78
45 mn	"	1,56
2 h	"	1,46
4 h	"	1,73
6 h	"	1,49

2.2.2.2. Répartition tissulaire

Nos résultats portés dans le tableau et sur la figure III montrent que tous les tissus, à l'exception du tissu adipeux, renferment des concentrations de quinidine de 5 à 30 fois supérieures à celles du plasma.

Foie, poumon, rein viennent largement en tête avec respectivement des taux moyens de 125, 118 et 116,5 $\mu\text{g/g}$ alors que la rate présente une concentration nettement inférieure (56,5 $\mu\text{g/g}$). Comme lors de nos premières expériences, le muscle cardiaque retient bien davantage de quinidine que le muscle du squelette

mais une hétérogénéité certaine marque les taux du ventricule, de l'oreillette et de l'auricule :

Muscle strié du squelette :	25,5	µg/g
Ventricule :	55,3	"
Oreillette :	42,7	"
Auricule :	37,2	"

Remarquons que le diaphragme possède des teneurs supérieures de 35 % à celles du muscle du squelette (taux moyen : 34,8 µg/g) .

Enfin, il faut insister sur le fait que le cerveau retient l'alcaloïde en quantité appréciable (51,5 µg/g) alors que le tissu adipeux est de loin le tissu le plus pauvre.

2.2.2.3. Cinétique de la fixation tissulaire

. Cinétique hépatique

La fixation hépatique, rapide, massive, ne subit que des variations minimes pendant les 15 premières minutes : 219 µg/g en fin de perfusion, 213 15 minutes après. Mais de la 15ème minute à la 2ème heure, les concentrations hépatiques chutent nettement, passant à 180 µg/g (45ème minute) puis à 146 µg/g (2ème heure). De la 2ème à la 6ème heure, la décroissance se ralentit très sensiblement, ce que ne rend pas la moyenne du tableau IV qui laisserait croire qu'entre la 4ème et la 6ème heure, on assiste à une chute accélérée. En fait, deux chiens sacrifiés à la 4ème heure, s'ils ont contribué à établir la moyenne à ce temps-ci, n'ont pu influencer celle de la 6ème heure.

. Fixation de la quinidine par le muscle du squelette

Comme nous l'avons précédemment constaté (p. 62), les résultats sont anarchiques jusqu'à la 2ème heure. En effet, chez 4 de nos 7 chiens, les taux décroissent nettement après la fin de la perfusion et chez les 3 autres, les concentrations aug-

mentent non moins nettement, ce qui se traduit par une relative stabilité de la moyenne.

Au-delà de la 2ème heure, les concentrations musculaires fléchissent chez tous les animaux, particulièrement entre la 4ème et la 6ème heure (Tableau et figure 5).

. Cinétique de la fixation cardiaque

La cinétique cardiaque sur laquelle nous avons porté toute notre attention a été nettement précisée, d'autant mieux que les résultats obtenus chez nos 7 chiens sont parfaitement concordants (Tableau et figure 6) .

Cette cinétique présente deux aspects remarquables :

- le premier réside dans la fixation rapide et importante de la quinine puisque la concentration moyenne atteint 160 $\mu\text{g/g}$ en fin de perfusion ; le chien n° 2 présente même un taux auriculaire supérieur au taux hépatique.

- le deuxième tient dans la chute très marquée des taux auriculaires jusqu'à la 2ème heure, rappelant ainsi la cinétique hépatique. Par la suite, la décroissance bien que moins vive reste néanmoins très nette. La cinétique auriculaire se distingue ainsi de la cinétique hépatique et, si en fin d'injection le taux auriculaire moyen est près de 4 fois supérieur à celui du muscle du squelette, 6 heures après, il ne l'est plus que de 1 fois et demie.

D'autre part, le rapport entre les concentrations auriculaires et plasmatiques, est très variable : chez un même chien, et d'un chien à un autre. Encore atteint-il sa valeur la plus élevée à la 15ème ou à la 45ème minute et décroît-il ensuite assez régulièrement (Tableau VI bis) .

TABLEAU I

DOSAGE de QUINIDINE PLASMATIQUE chez des CHIENS AYANT RECU par V.I.V. 50 mg/kg en 50 minutes

CHIENS	1	2	3	4	5	6	7	Moyenne (M)
Fin de perfusion	28,4	46,5	19	15,9	14,4	35,5	35,5	27,9
15' après	9,6	11,8	10,3	9,6	11,2	11	16,5	11,4
45' après	6,5	8,3	7,9	7,2	9,2	10,5	14,8	9,2
2 h après	4,8	6,1	6,6	6,5	8,1	10,3	13,6	8
4 h après	3,6	5,2	5,7	6,4	7,8	-	-	5,7
6 h après	3,3	4,6	5,7	-	-	-	-	4,5

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/ml}$ de plasma.

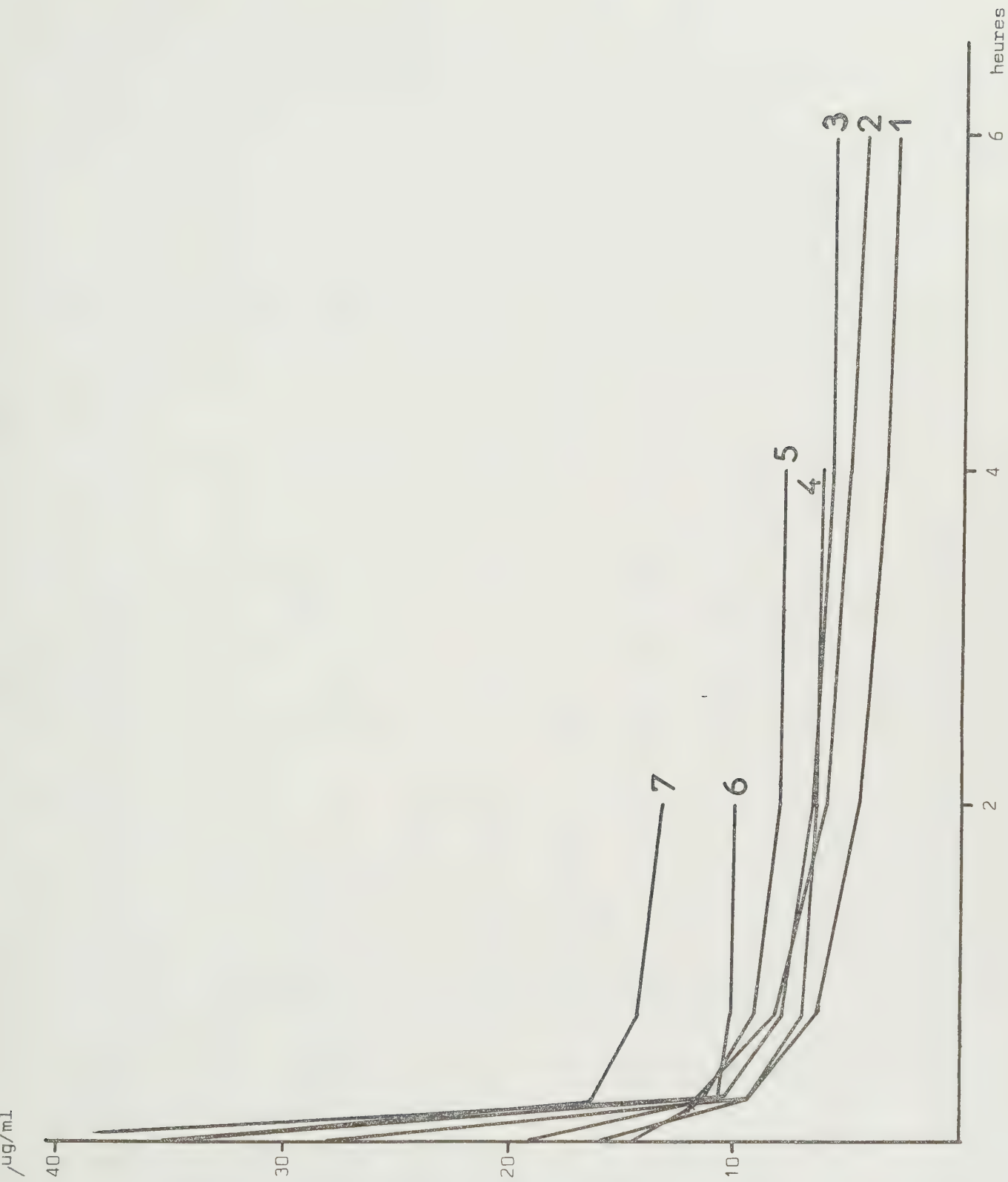


Fig. 1 Décroissance plasmatique de la quinine après administration I.V. de 50 mg/kg .

TABLEAU II

DOSAGE DE QUINIDINE GLOBULAIRE chez des CHIENS AYANT RECU par V.I.V. 50 mg/kg en 50 minutes

CHIENS	1	2	3	4	5	6	7	Moyenne (M)
Fin de la perfusion	58,8	115	37,8	36,4	34,8	68,5	63	59,2
15' après	17,2	30,5	15,2	22,3	22,4	15	20,3	20,4
45' après	11,3	20,4	10,7	15,7	17,6	11,5	13,8	14,4
2 h après	7,8	13,8	7,3	13,8	14,1	11,9	13,4	11,7
4 h après	5,7	12,3	5	12,6	13,7	-	-	9,9
6 h après	4,8	9,6	5,6	-	-	-	-	6,7

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/ml}$ de globules rouges.

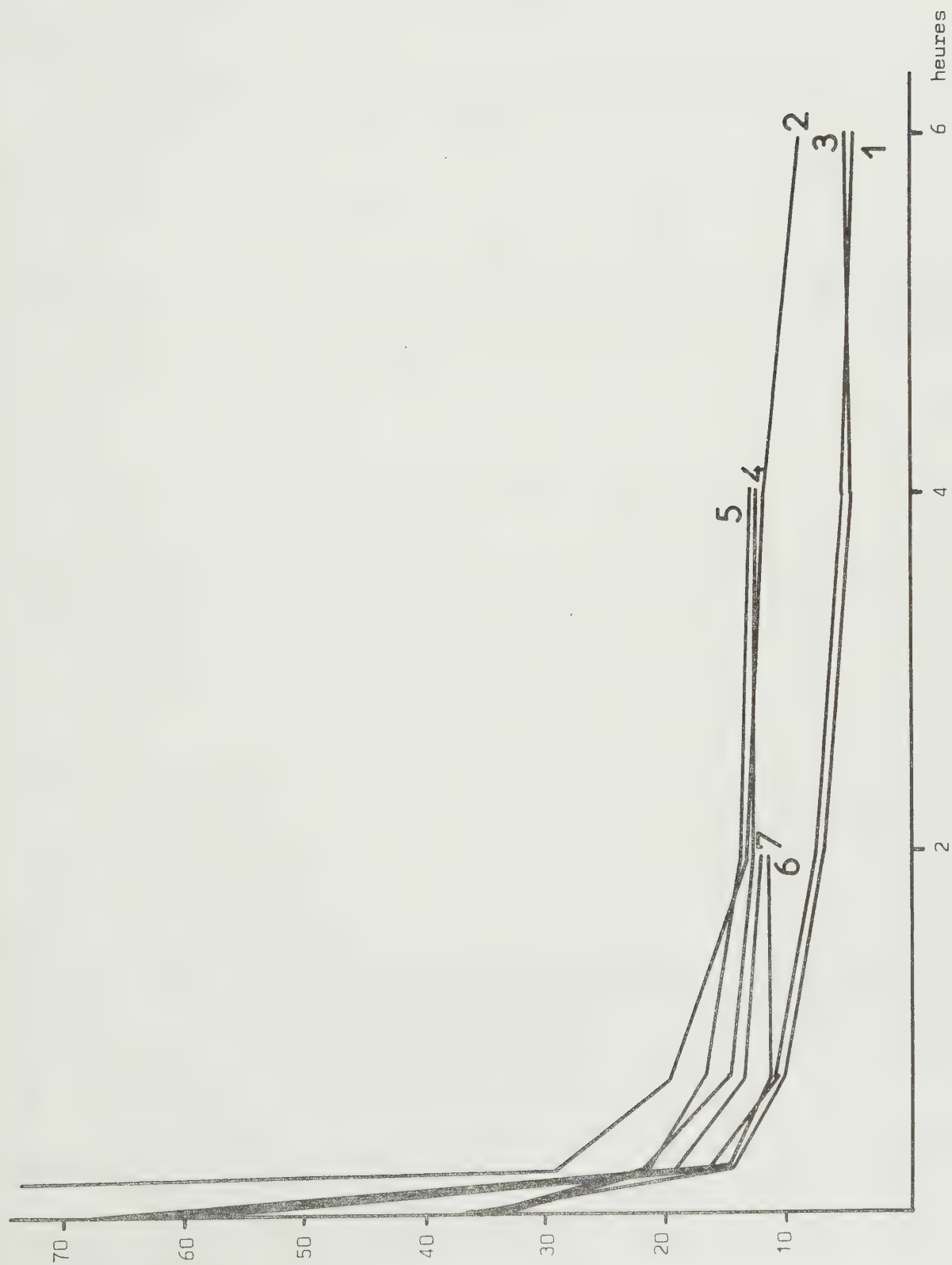


Fig. 2 Décroissance globale de la quinidine après administration I.V. de 50 mg/kg .

REPARTITION TISSULAIRE de la QUINIDINE chez des CHIENS AYANT RECU par V.I.V. 50 mg/kg en 50 minutes

CHIENS	1	2	3	4	5	6	7	Moyenne (M)
FOIE	60	152	61	146	205	141	147	125
POUMON	73	158	54	109	197	153	240	118
REIN	76	144	78	119	165	94	98	116,5
RATE	36	67	57	69	53	65	77	56,5
CERVEAU	18	50	16	81	93	62	68	51,5
VENTRICULE DROIT	26	68,5	27	73	77	65	87	54,3
VENTRICULE GAUCHE	29	66	29	76	82	67	89,5	56,4
OREILLETTE DROITE	23	52	22,5	52	62	49	58	42,3
OREILLETTE GAUCHE	22	54	16	49	75	62	58	43,2
AURICULE	19	46	20	44	57	56	57	37,2
DIAPHRAGME	15	37	14	44	64	-	53	34,8
MUSCLE	14	28,5	11,5	31	43	33	33	25,5
GRAISSE	2,5	16	3,7	6,5	10,5	17	13	7,8

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ d'organe.

Les prélèvements ont été effectués 6 heures après la fin de la perfusion sur les chiens 1, 2, 3 - 4 heures après la perfusion sur les chiens 4 et 5.- 2 heures après la perfusion sur les chiens 6 et 7.
La moyenne a été obtenue d'après les dosages réalisés sur les 5 premiers chiens.

ug/ g

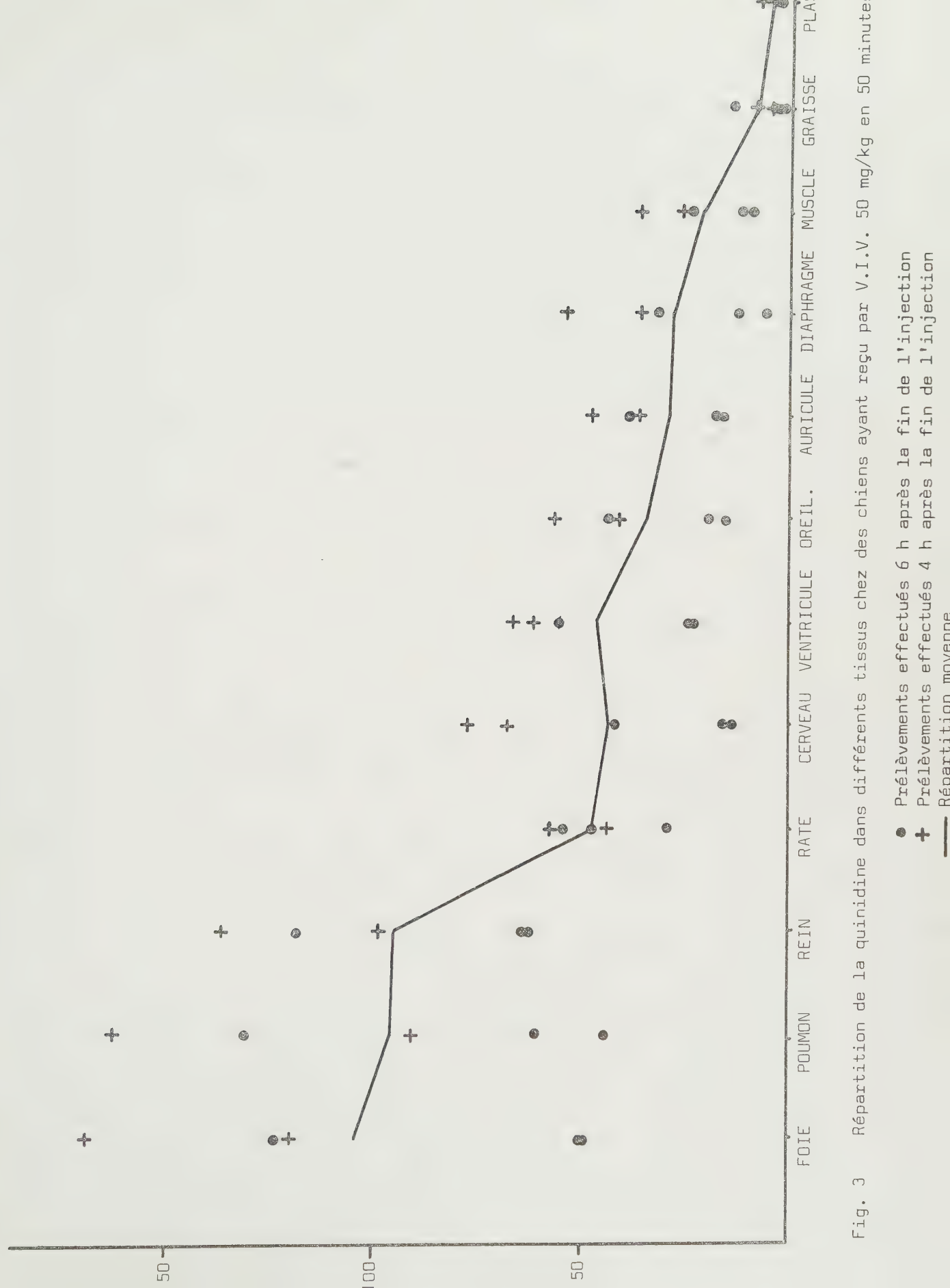


Fig. 3 Répartition de la quinidine dans différents tissus chez des chiens ayant reçu par V.I.V. 50 mg/kg en 50 minutes

● Prélèvements effectués 6 h après la fin de l'injection
+ Prélèvements effectués 4 h après la fin de l'injection
— Répartition moyenne

FIXATION HEPATIQUE de la QUINIDINE chez des CHIENS AYANT RECU par V.I.V. 50 mg/kg en 50 minutes

CHIENS	1	2	3	4	5	6	7	Moyenne (M)
Fin de la perfusion	154	194	192	244	303	195	254	219
15' après	156	211	212	214	299	205	197	213
45' après	98	207	138	202	278	147	191	180
2 h après	75	174	99	152	231	141	147	146
4 h après	70	166	88	146	205			135
6 h après	60	152	61					91

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ d'organe.

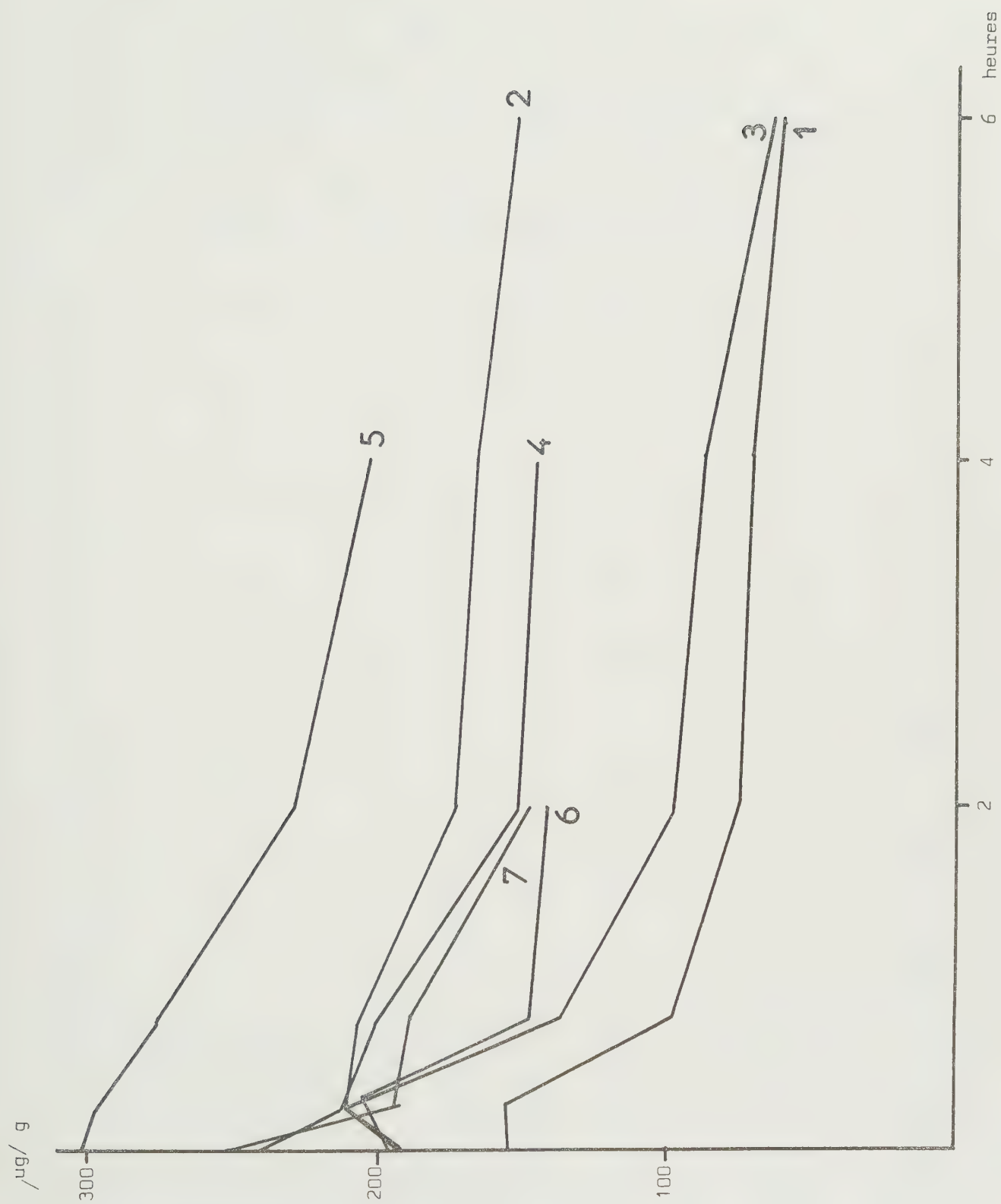


Fig. 4 Fixation hépatique de la quinidine après administration I.V. de 50 mg/kg .

FIXATION par le MUSCLE STRIE de la QUINIDINE chez des CHIENS AYANT RECU par V.I.V. 50 mg/kg en 50 minutes

CHIENS	1	2	3	4	5	6	7	Moyenne (M)
Fin de la perfusion	46	23	33	53	48	41	60	43,4
15' après	41	29,5	22	40	59	49	46	40,9
45' après	34	38	25	37	61	57	37	41,3
2 h après	28	44	20	34	52	33	33	34,9
4 h après	27	31	19	31	43	-	-	30,2
6 h après	14	28,5	11,5	-	-	-	-	18

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ d'organe.

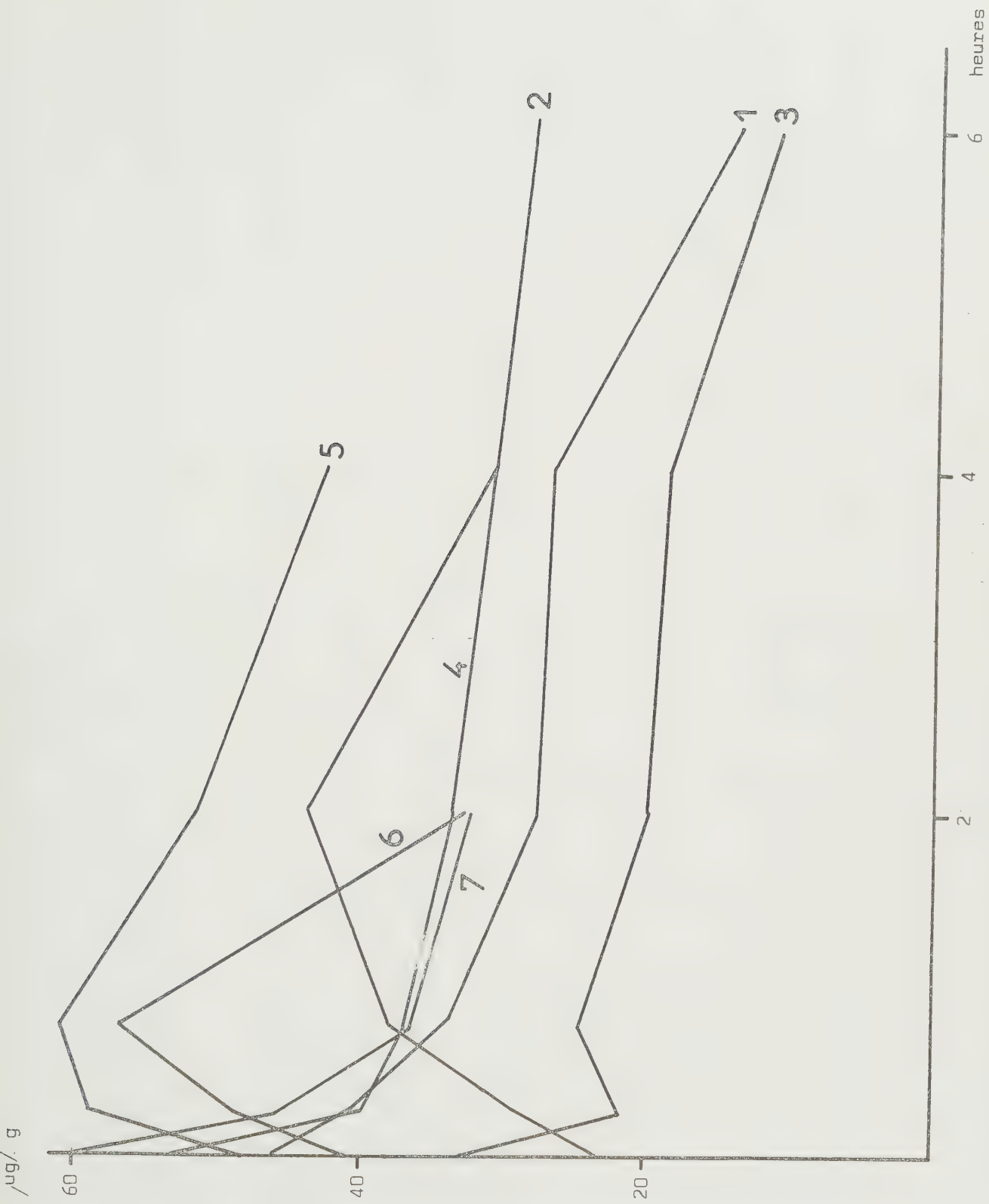


Fig. 5 Fixation par le muscle strié de quinidine, après administration I.V. de 50 mg/kg .

TABLEAU VI

FIXATION par L'AURICULE de la QUINIDINE chez des CHIENS AYANT RECU par V.I.V. 50 mg/kg en 50 minutes

CHIENS	1	2	3	4	5	6	7	Moyenne (M)
Fin de la perfusion	138	232	102	-	185	98	208	160,5
15' après	138	202	93	145	164	100	149	141,5
45' après	98	171	72	129	129	83	109	113
2 h après	51	129	-	78	113	56	57	80,5
4 h après	-	-	-	44	57	-	-	50,5
6 h après	19	46	20	-	-	-	-	28,5

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ d'organe.

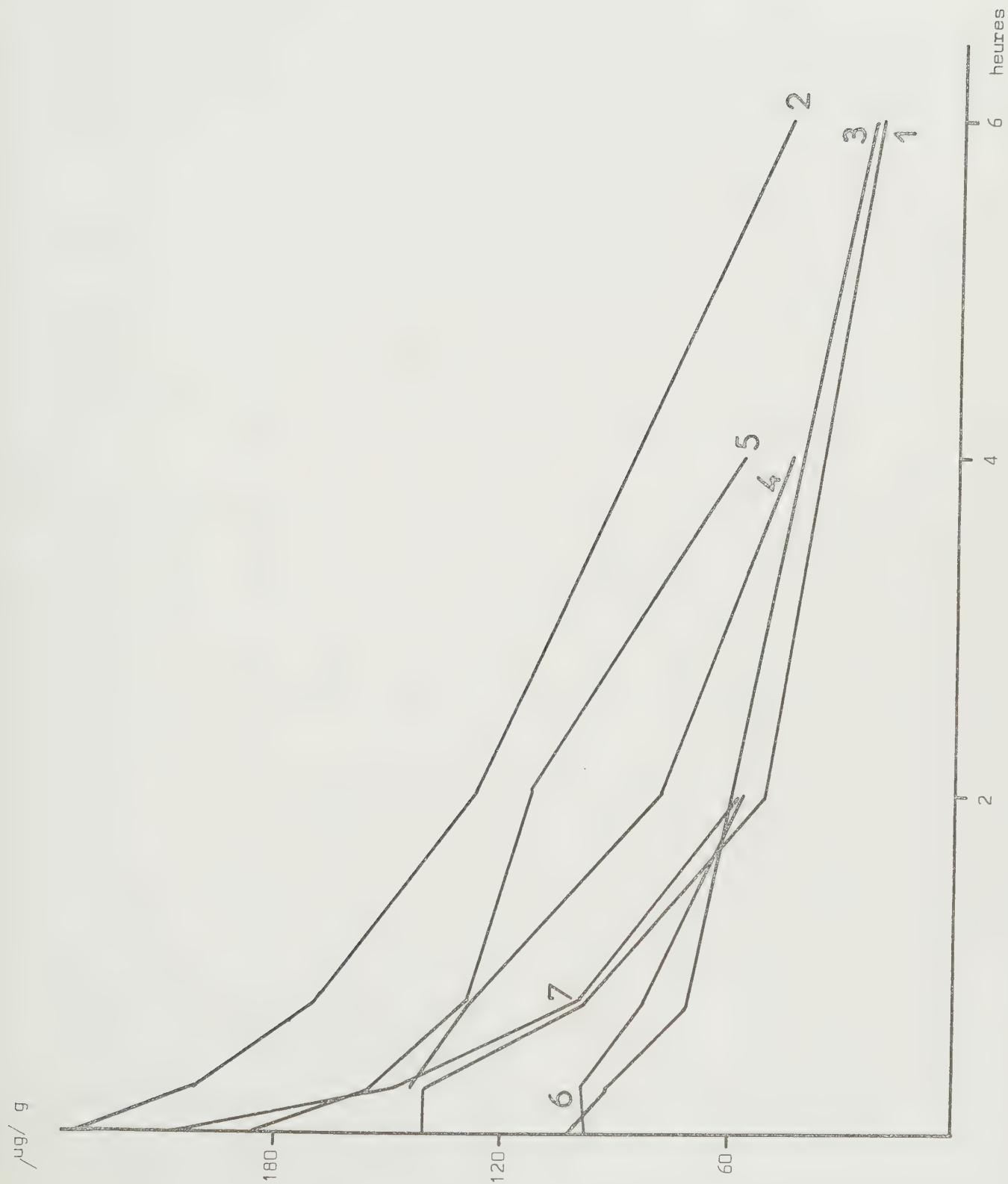


Fig. 6 Fixation par l'auricule de quinidine, après administration I.V. de 50 mg/kg .

EVOLUTION DU RAPPORT entre les concentrations AURICULAIRES ET PLASMATIQUES , chez des chiens ayant reçu par V.I.V.

50 mg/ kg en 50 minutes

CHIENS	1	2	3	4	5	6	7	Moyenne (M)
Fin de la perfusion	4,86	4,99	5,36	-	12,84	2,76	5,86	6,11
15' après	14,37	17,12	9,03	15,10	14,64	9,09	9,03	12,62
45' après	15,07	20,60	9,11	17,91	14,02	7,90	7,36	13,14
2 h après	10,62	21,14	-	12	13,95	5,43	4,19	11,22
4 h après	-	-	-	6,87	7,30	-	-	7,08
6 h après	5,75	10	3,51	-	-	-	-	6,75

TABLEAU VII

TAUX MOYENS de QUINIDINE chez des CHIENS AYANT RECU par V.I.V. 50 mg/kg en 50 minutes

	PLASMA	HEMATIES	FOIE	MUSCLE	AURICULE
Fin de perfusion	27,9	59,2	219	43,4	160,5
15' après	11,4	20,4	213	40,9	141,5
45' après	9,2	14,4	180	41,3	113
2 h après	8	11,7	146	34,9	80,5
4 h après	5,7	9,9	135	30,2	50,5
6 h après	4,5	6,7	91	18	28,5

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ d'organe ou en $\mu\text{g/ml}$ de liquide biologique.

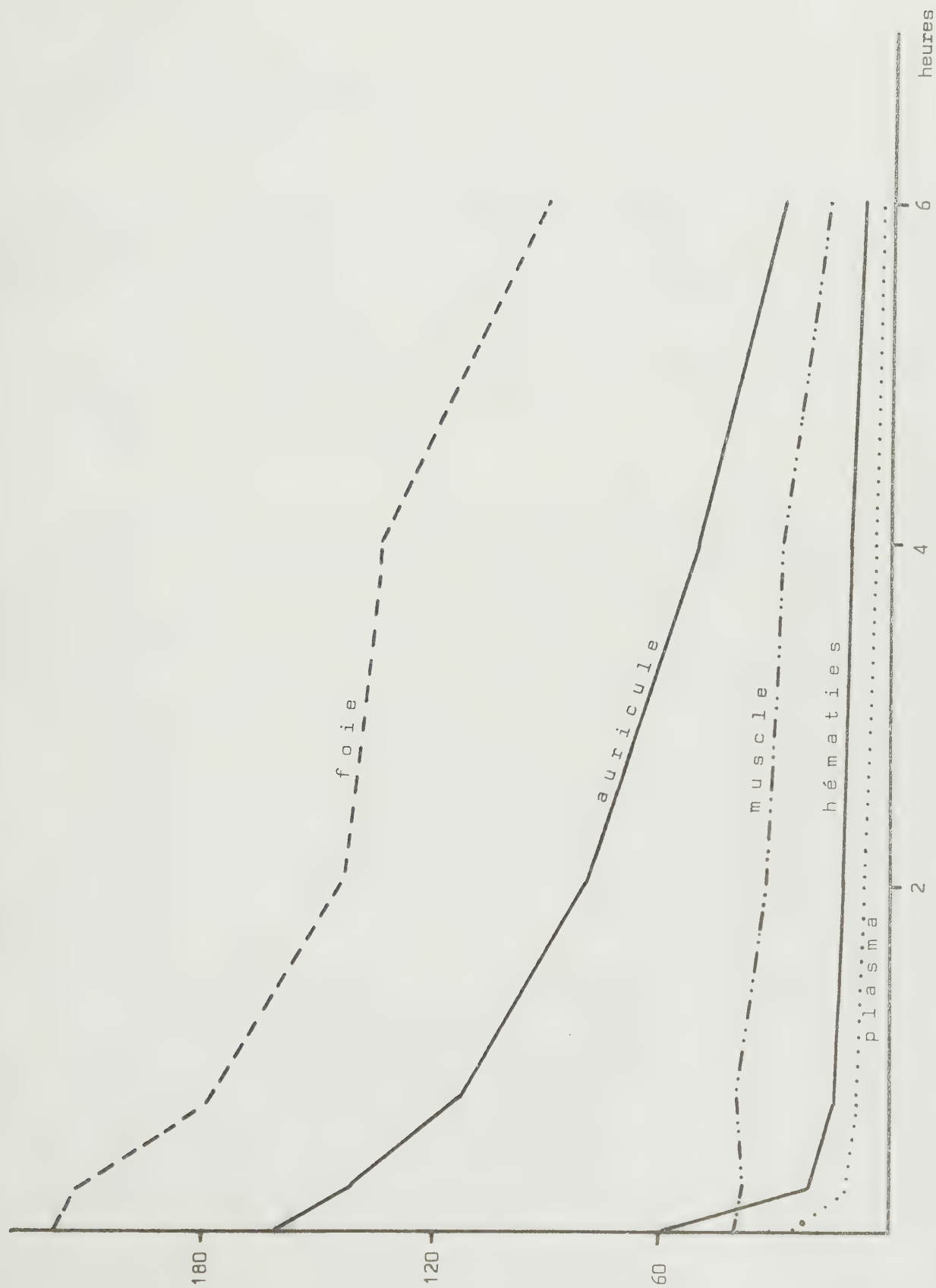


Fig. 7 Evolution moyenne des concentrations de quinidine dans différents tissus et milieux chez des chiens ayant reçu par V.I.V. 50 mg de quinidine par kg de poids .

2.3. Discussion

La très rapide diminution du taux plasmatique de la quinidine s'explique par la diffusion de la substance à la totalité du secteur extra-cellulaire et par son stockage intra-cellulaire. Les tissus sont en effet capables de soustraire au secteur extra-cellulaire d'importantes quantités de quinidine, en raison d'une affinité qui est vive le plus fréquemment. Outre le foie, le myocarde, le poumon, le rein, la rate possèdent de telles capacités de fixation. Par contre, le muscle strié présente une affinité moindre, que compense cependant son importance pondérale.

Etant donné que les taux l'emportent de beaucoup dans presque tous les organes sur le taux plasmatique, on ne saurait voir dans la captation le résultat de propriétés particulières de certaines cellules, appartenant par exemple au système réticulo-endothélial. Sans doute, des facteurs physique (solubilité dans le protoplasme) et chimique (liaison aux protéines cellulaires) interviennent-ils. Mais ne serait-ce pas d'abord l'abondance de l'irrigation qui conditionnerait l'importance de la fixation ? En effet, les organes qui fixent davantage et plus vite (poumon, rein, foie, rate) la quinidine sont ceux dont la circulation est fonctionnelle en même temps que nutritive. A l'opposé, le muscle au repos fixe peu et lentement. Mais le myocarde, plus largement irrigué en temps que muscle en activité, présente des taux supérieurs qui ne sont pas liés à une structure sensiblement différente, car le diaphragme nous a révélé des taux voisins.

Les modifications apportées par l'insuffisance cardiaque à la teneur du sang en quinidine peuvent être retenues en faveur de cette hypothèse. Si celle-ci est exacte, la fixation de l'alcaloïde doit effectivement être entravée par le ralentissement circulatoire et de plus grandes quantités doivent en conséquence rester présentes dans le sang. Or la quinidinémie serait précisément proche du double de la quinidinémie normale durant plusieurs heures (53,58,59), sans que la dépression des fonctions rénales et hépatiques qui s'associe à la défaillance car-

diague puisse être incriminée à l'origine du phénomène, celui-ci ne s'observant pas dans les néphrites ni les cirrhoses avancées.

L'importance de la fixation serait en outre influencée par un deuxième facteur : le niveau de l'activité métabolique du tissu en question (76,77).

L'importance de la dose ne semble pas avoir de grande incidence sur le partage entre les divers tissus. On remarquera cependant que l'affinité de la quinidine pour la substance cérébrale paraît bien plus vive à la forte qu'à la faible dose, puisque le rapport des teneurs excède 40 : à défaut d'en donner une explication satisfaisante, au moins peut-on voir là la cause d'effets secondaires apparaissant surtout aux posologies élevées.

Il convient également de retenir que le rapport érythro-plasmatique est sensiblement inverse (0,55 et 1,49) aux doses thérapeutiques et toxiques. C'est un cas particulier du fait que le rapport des concentrations entre milieu cellulaire et plasma est aux doses toxiques 2 à 3 fois supérieur à ce qu'il est aux doses thérapeutiques.

Quoi qu'il en soit, cette constatation nous amène à évoquer la fixation de l'alcaloïde par divers éléments constitutifs d'un tissu ou d'un organe. ARORA (73) ayant attiré l'attention sur un taux de quinidine s'élevant dans le myocarde ventriculaire près de 2 fois plus haut que dans le myocarde auriculaire, il était permis de se demander si cette inégalité ne pourrait pas intervenir dans l'action de la quinidine sur l'automatisme cardiaque. Bien que nous ayons pris la précaution de doser la quinidine dans les parois des cavités homologues droite et gauche, qui ne se différencient pas à cet égard, aucun écart significatif n'a été découvert aux doses thérapeutiques, et l'écart enregistré aux doses toxiques est inférieur à 25 %. Dans de telles conditions, il est difficile de faire appel à un argument d'ordre chimique pour expliquer une incidence pharmacologique ne revêtant pas partout la même intensité.

Ce processus de captation tissulaire de la quinidine est pratiquement immédiat, puisque les concentrations sont maxima à la fin de l'in-

jection aux doses toxiques et 5 minutes après aux doses thérapeutiques, exception faite toutefois dans cette éventualité de la concentration musculaire.

Si le temps nécessaire aux cellules pour se charger en quinidine est très bref, elles s'en déchargent évidemment beaucoup plus lentement, et dans la chute de la teneur cellulaire, deux périodes se distinguent, tout au moins en ce qui concerne foie et auricule : une phase de déclin rapide s'étend sur les deux premières heures et cède ensuite la place à une phase de lente décroissance. Cette évolution avait déjà été notée par WEGRIA et BOYLE (61), en dépit d'une méthode de dosage moins satisfaisante. La disparition de la quinidine n'est imputable que pour une faible part à son élimination de l'organisme car, examinant l'excrétion urinaire et biliaire pendant les 2 premières heures, nous avons trouvé la première égale à 2 % et la seconde inférieure à 1 % . La quinidine subit donc une dégradation en métabolites non dosés, sans doute secondairement dirigés vers le rein.

Enfin, on doit retenir que le rapport entre les concentrations auriculaires et plasmatiques varie très largement en fonction de plusieurs facteurs (moment, dose, animal d'expérience etc ...) . Par conséquent, il est hasardeux de vouloir évaluer l'intensité de l'effet exercé d'après la quinidinémie. Celle-ci ne permet guère effectivement de présager le succès ou l'échec thérapeutique.

3. CONCLUSION

La quinidine pénètre dans le milieu cellulaire dans des proportions variables selon les organes, et les facteurs, nombreux, qui règlent le rapport entre concentrations sanguines et tissulaires, sont difficiles à cerner, de sorte qu'il est délicat de tirer de la teneur plasmatique des renseignements précis quant à l'ampleur de l'action thérapeutique.

B. LIAISON DE LA QUINIDINE AUX PROTEINES SERIQUES DU CHIEN - ETUDE PAR FILTRATION SUR GEL
ET PAR ELECTROPHORESE SUR PAPIER

1. INTRODUCTION - TRAVAUX ANTERIEURS

Dans l'étude de la liaison des protéines sériques aux médicaments, un certain nombre de méthodes ont été préconisées. Citons la dialyse en équilibre, la dialyse dynamique, l'ultrafiltration, la précipitation, l'électrophorèse et la filtration sur gel. Ce type d'étude est particulièrement important puisqu'il est établi que les médicaments liés aux protéines sont inactifs, alors que les formes dites "libres" sont pharmacologiquement actives et diffusibles. D'autre part, la liaison des médicaments aux protéines influence leur excrétion urinaire, la forme libre étant seule soumise à la filtration glomérulaire. Enfin, le passage des molécules médicamenteuses du sang dans les tissus dépend, dans une certaine mesure, de l'importance de la fraction non liée.

La liaison protéinique des médicaments a fait l'objet de quelques revues générales très documentées que l'on consultera avec intérêt (78-82) .

En ce qui concerne la quinidine, un seul travail s'est attaché à l'étude de sa liaison avec les protéines : celui de CONN et LUCHI (83,84). Ces auteurs ont utilisé la dialyse équilibrée. Leur protocole était le suivant : 20 ml de tampon phosphate 0,20 M contenant 250 mg d'albumine humaine et de la quinidine à diverses concentrations, sont placés dans un sac de cellophane, baignant dans 50 ml du même tampon. La dialyse s'effectue à 25° pendant 18 h .

Les résultats obtenus permirent à CONN et LUCHI de "prévoir" que la quinidine se trouve liée à 80 % à l'albumine, ceci pour une quinidinémie de 5 $\mu\text{g/ml}$. A pH 7,4 , la constante de dissociation du complexe albumine-quinidine serait de $1,3 \cdot 10^{-4}$, ce qui traduit une association "modérément importante". En outre, chaque molécule d'albumine posséderait un site récepteur, et la quinidine ne serait pas liée aux globulines .

Dans le cadre de notre travail concernant le métabolisme de la quinidine chez le Chien, il nous a semblé bon de reprendre cette étude de la liaison de la quinidine aux protéines. Nous avons utilisé d'une part la filtration sur gel de Séphadex, d'autre part l'électrophorèse sur papier.

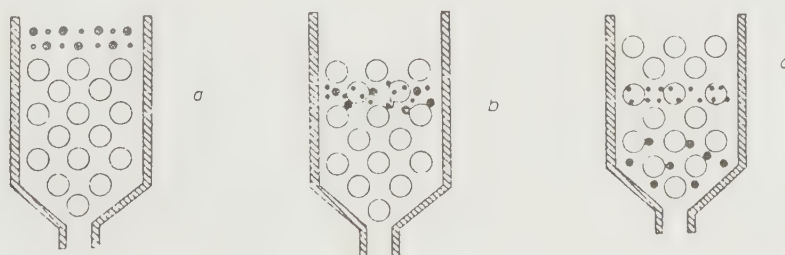
2. TRAVAUX PERSONNELS

2.1. Etude de la liaison protéinique de la quinidine par filtration sur gel de Séphadex

2.1.1. La filtration sur gel de Séphadex : généralités et principe (85)

Les Séphadex sont des polymères réticulés préparés à partir de dextrans et formant un réseau tri-dimensionnel de chaînes de polysaccharides. Ils se présentent en petits granules et possèdent la propriété de gonfler dans l'eau en donnant un gel. Ce gel de dextrane est caractérisé par l'existence de deux compartiments aqueux. Une première phase aqueuse est emprisonnée dans le réseau, elle est incluse dans le gel et constitue son eau d'imbibition ; la seconde phase est extérieure aux granules gélifiés et représente l'eau intersticielle. Les substances de haut poids moléculaire dont la taille est supérieure à celle des mailles du Séphadex seront exclues du gel et resteront dans l'eau intersticielle, alors que celles de faible poids moléculaire pénétreront aisément dans le réseau et gagneront l'eau d'imbibition du gel. Aussi, si l'on fait passer sur une colonne garnie d'un gel de dextrane une solution contenant des substances de poids moléculaires très différents, les molécules les plus grosses cheminent rapidement, alors que les plus petites diffusant librement à l'intérieur du gel, progresseront plus lentement (figure ci-dessous). Les substances recueillies à la base de la colonne apparaîtront dans l'ordre de leurs poids moléculaires décroissants.

La chromatographie sur gel permet donc de séparer le médicament "libre" de celui lié aux protéines. Nous avons utilisé cette possibilité offerte par les Séphadex pour déterminer le degré de liaison protéinique de la quinidine.



Représentation schématique de trois phases d'une chromatographie sur gel

2.1.2. Méthode

Notre étude a été conduite sur colonne de Séphadex G 25 coarse :

caractéristiques de la colonne : diamètre 1,5 cm - longueur 30 cm

caractéristiques du Séphadex : eau fixée 2,5 g/g - taille des particules à l'état sec 100 - 300 μ - volume occupé par le gel 5 ml par g de gel sec - limite d'exclusion du gel exprimée en masse moléculaire 5000 .

Le Séphadex est équilibré pendant 3 - 4h, sous agitation, contre 20 fois son volume d'un tampon phosphate 0,15 M, de pH 7,40 . De temps à autre, l'agitation est stoppée ; on laisse le gel sédimenter et on élimine une partie du surnageant ; ceci permet d'ôter les particules les plus fines non décantées. Cette opération est répétée jusqu'à ce que la sédimentation soit régulière. Puis la colonne est remplie de la suspension de Séphadex. Elle ne sera utilisée qu'après un délai de 24 h.

Sur cette colonne, seront soumis à la chromatographie des sérums de chiens contenant de la quinidine. Ces sérums sont chargés de doses toxiques ou thérapeutiques de quinidine et sont mis à incuber à 37° pendant 1h 30, ou bien proviennent de chiens auxquels ont été administrées par voie I.V. des doses toxiques ou thérapeutiques de quinidine.

Dans le cas de sérums contenant un taux thérapeutique de quinidine (5 μ g/ml), le dépôt est de 1 ml ; ce dépôt est réduit à 0,5 ml en cas de taux toxiques (30 μ g/ml). L'élution est réalisée par du tampon phosphate 0,15 M de pH 7,40 , dont la vitesse d'écoulement est réglée à 1 ml/mn. L'éluat est divisé en 50 fractions de 2 ml chacune ; sur chaque fraction, sont dosés les protéines et la quinidine. La quinidine est dosée par la méthode précédemment décrite et les protéines selon la technique de DAUGHADAY, LOWRY et Coll. (86) : 0,2 ml de l'éluat est additionné de 10 ml d'un réactif cupro-alcalin. On mélange et attend 15 mn. Puis on ajoute 1 ml de réactif de FOLIN-CIOCALTEU (Merck n° 9001) dilué au 1/2 par de l'eau distillée. L'intensité de la coloration est évaluée au bout de 30 mn, à 700 nm (Spectrophotomètre UNICAM SP 800). Les résultats sont rapportés à une courbe d'étalonnage obtenue à partir d'une solution étalon de protéines.

2.1.3. Résultats

La figure 1 montre les modalités du passage des protéines et de la quinidine déposées séparément sur colonne de Séphadex G 25 . Les protéines sériques sont localisées dans les fractions n° 7 à 12, avec un maximum au niveau de la fraction n° 8 . Quant à la quinidine, elle commence à apparaître dans l'éluat au niveau de la fraction n° 19 et atteint un maximum dans la fraction n° 29 (fig. 1) .

Lorsqu'un sérum contenant de la quinidine est soumis à la chromatographie, on obtient les résultats suivants (Tableau I - figures 2, 3, 4 et 5) : les protéines sériques sont éluées dans les fractions 7 à 12 comme précédemment, tandis que la quinidine se répartit en deux pics d'inégale importance : une fraction (9 à 23 %) migre avec les protéines ("quinidine liée") ; le reste ("quinidine libre") est retrouvé dans les fractions 19 à 44 avec un maximum au niveau des fractions 28, 29, 30 .

Tableau I

	Taux de quinidine µg / ml	Quinidine liée %
Sérums chargés en quinidine	5	9,1
	28	11,9
Sérums de chiens ayant reçu par V.I.V. de la quinidine	5,05	22,9
	29,50	10,1

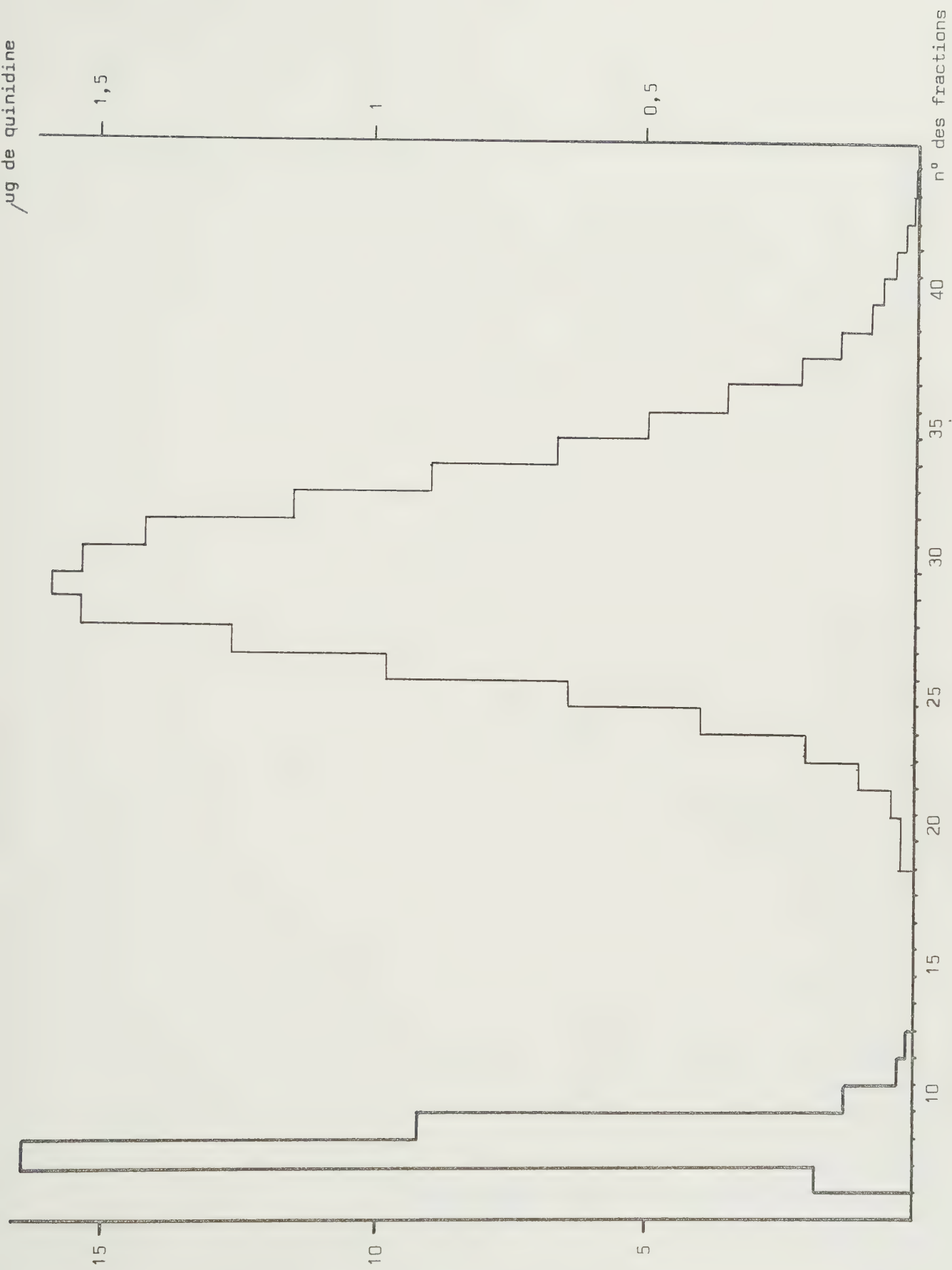


Fig. 1 Modalités du passage, d'une part des protéines sériques, d'autre part de la quinidine en l'absence de protéines, sur colonne de Séphadex G 25

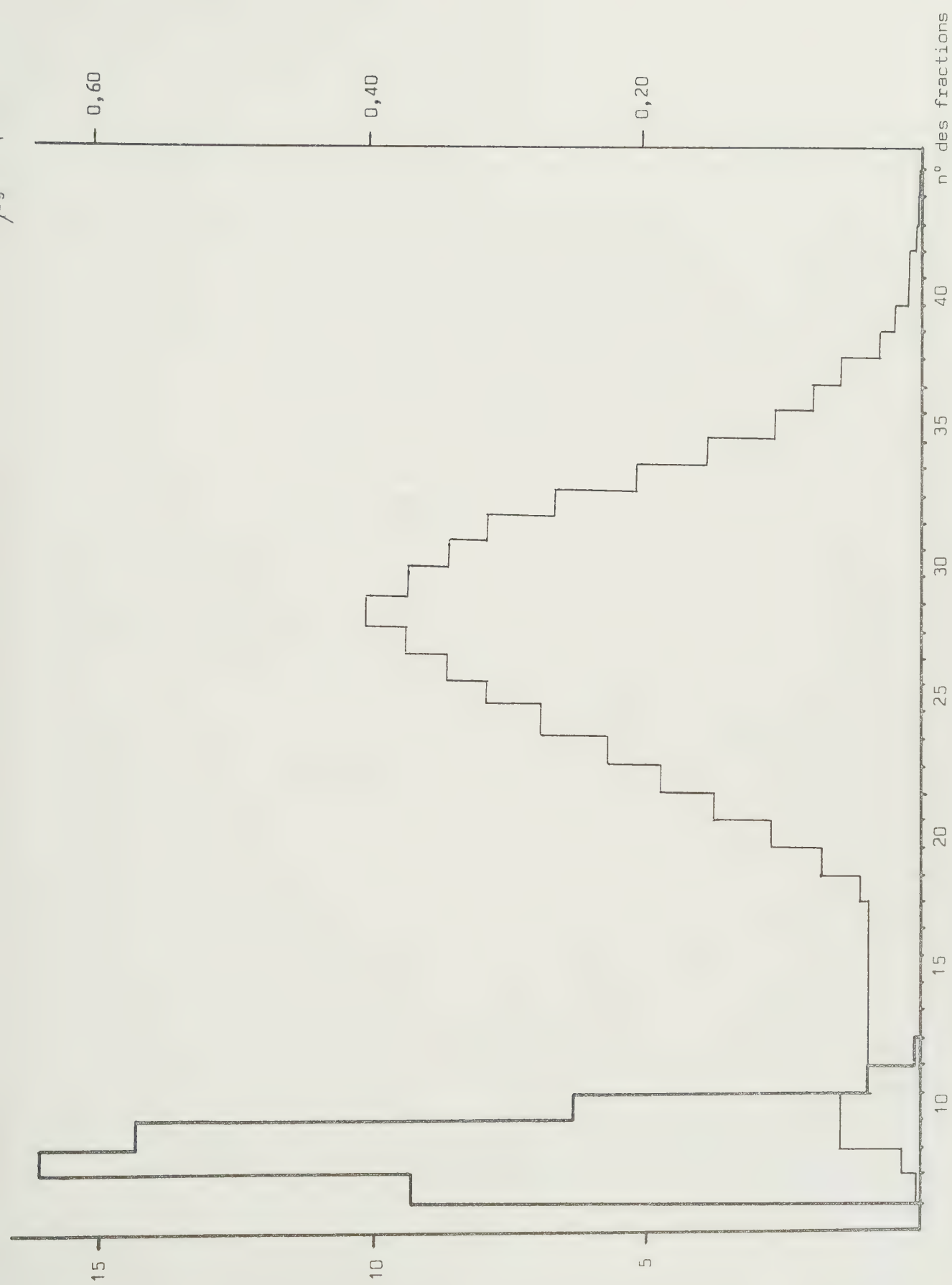


Fig. 2 Modalités du passage, sur colonne de Séphadex, de la quinidine ajoutée à du sérum sanguin
(Taux de quinidine : 5 $\mu\text{g/ml}$)

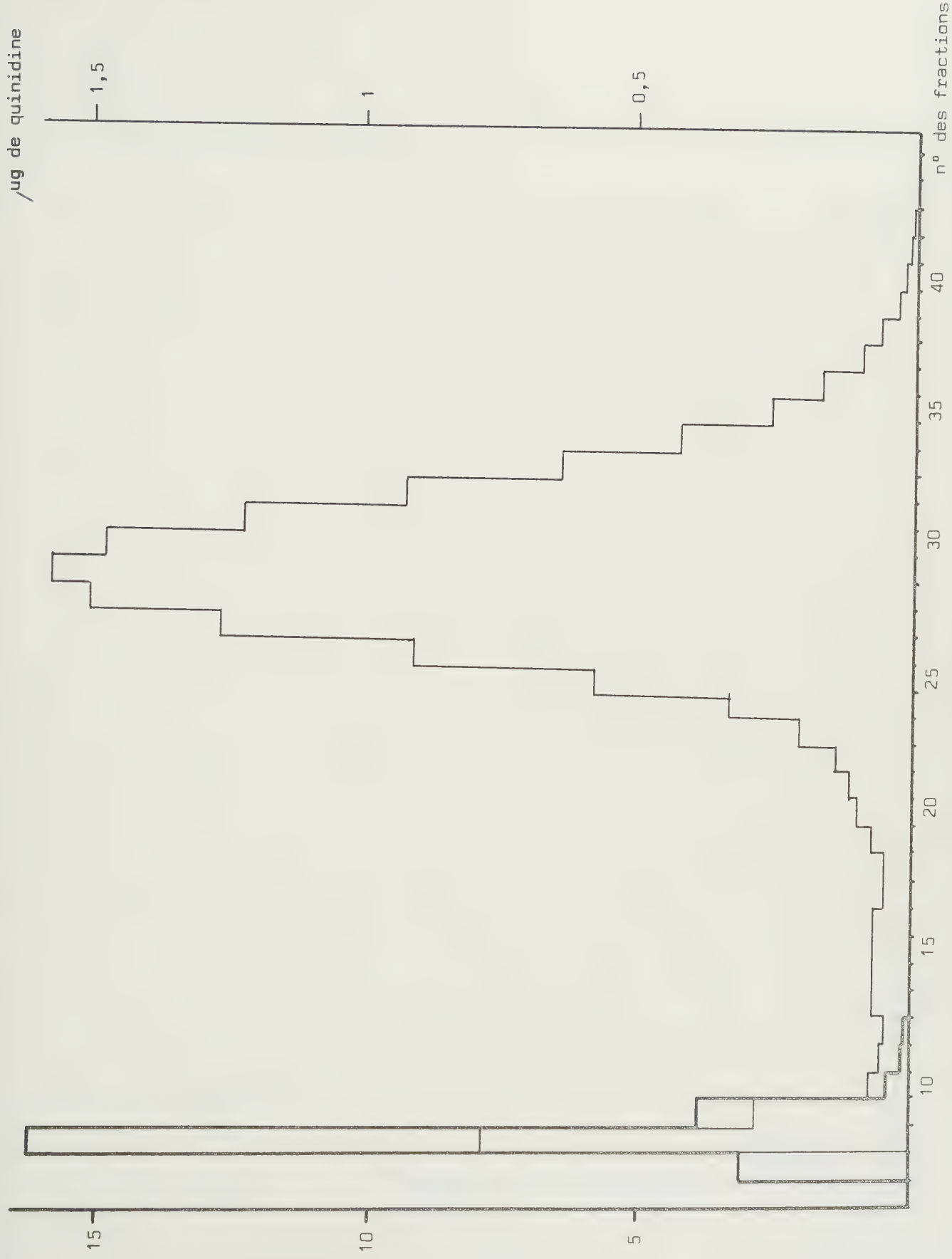


Fig. 3 Modalités du passage, sur colonne de Séphadex, de la quinidine ajoutée à du sérum sanguin
(Taux de quinidine : 28 µg/ml)

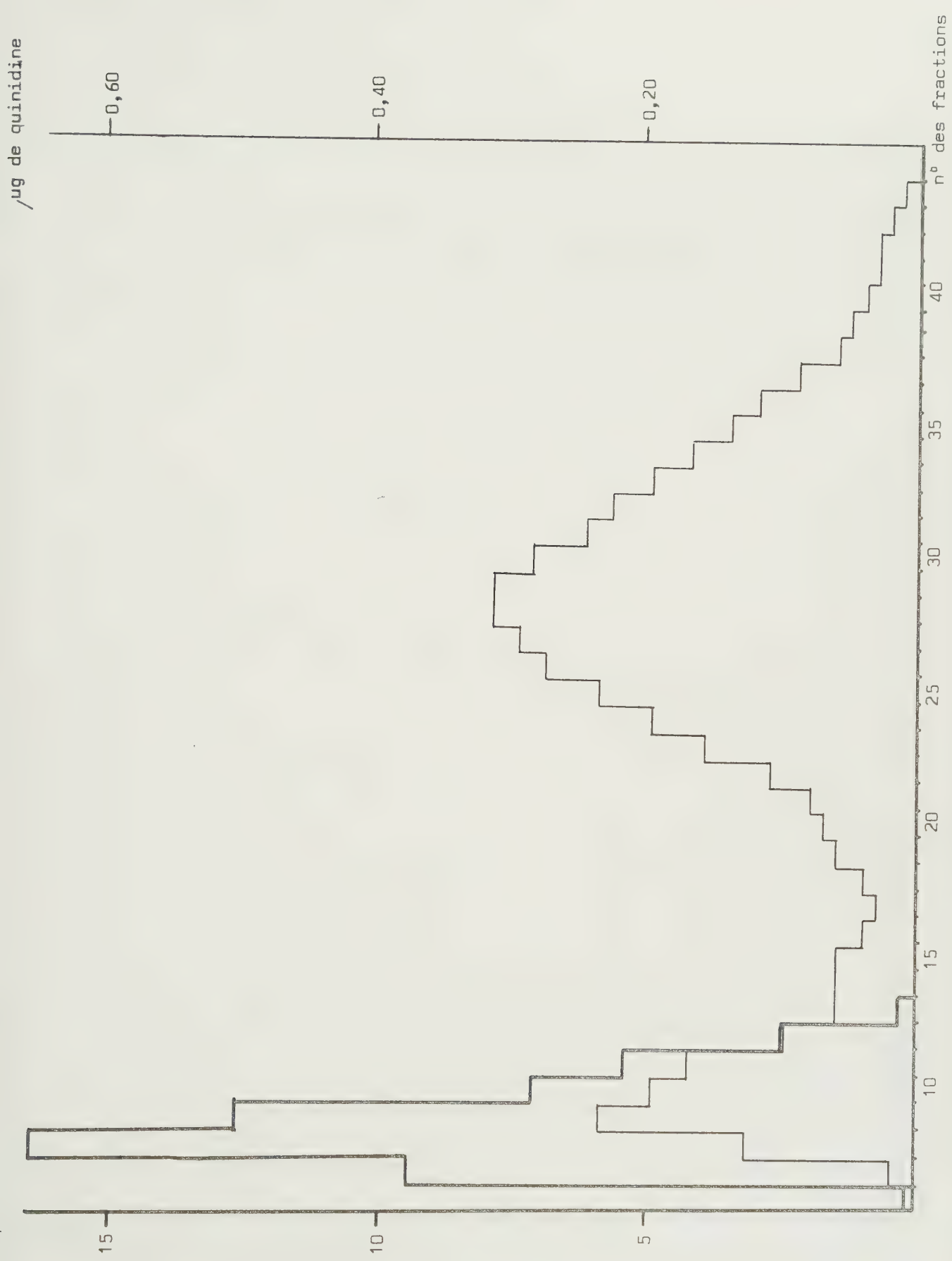


Fig. 4 Modalités du passage, sur colonne de Séphadex, de la quinidine contenue dans un sérum de chien. Ce sérum provenait d'un chien ayant reçu une dose thérapeutique de quinidine (quinidinémie : 5.05 µg/ml).

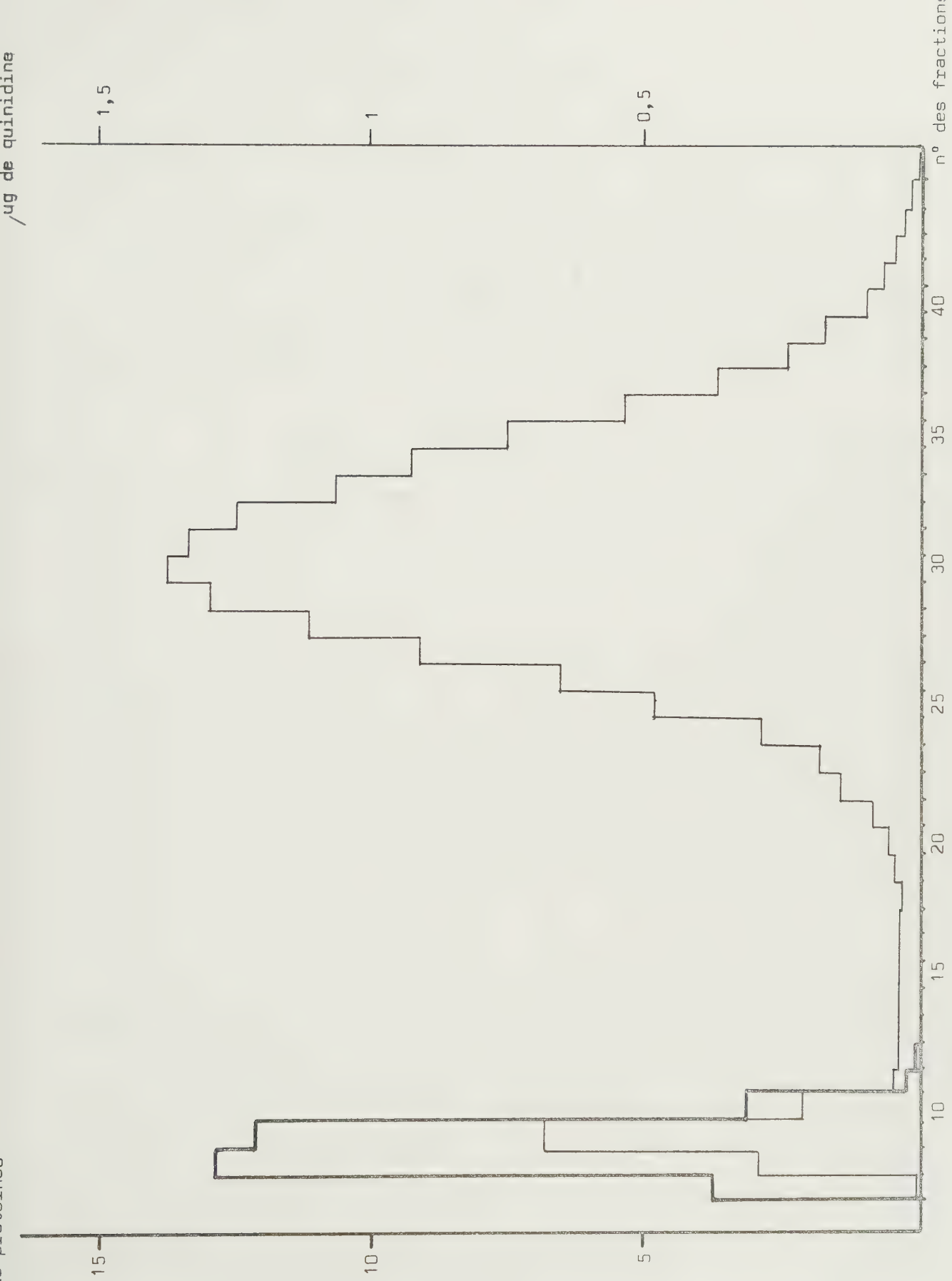


Fig. 5 Modalité du passage, sur colonne de Séphadex, de la quinidine contenue dans un sérum de chien. Ce sérum provenait d'un chien ayant reçu une dose toxique de quinidine (quinidinémie : 29,5 $\mu\text{g/ml}$).

2.1.4. Discussion

La filtration sur gel a été assez largement utilisée pour étudier la liaison des molécules médicamenteuses aux protéines sériques (87-94). Appliquée à la quinidine, cette méthode nous montre que 9 à 23 % seulement de ce composé sont liés aux protéines sériques du Chien. Pour sa part, CONN trouvait un pourcentage de liaison de la quinidine à l'albumine humaine, nettement supérieur, de l'ordre de 80 % .

Cette différence peut trouver plusieurs explications. Tout d'abord, le degré de liaison peut être différent chez l'Homme et chez l'Animal. Ensuite, nos conditions opératoires sont très éloignées de celles de CONN. Cet auteur employait l'albumine humaine, à faible concentration (12,5 g/litre), alors que nous utilisons du sérum de chien. Enfin, à la dialyse équilibrée nous avons préféré la filtration sur gel de Séphadex. Or cette dernière méthode doit être discutée.

En effet, certaines associations protéines-molécules médicamenteuses sont réversibles et peuvent, au cours de leur progression dans le gel, se dissocier. Aussi, établir au moyen des Séphadex qu'une molécule n'est pas ou qu'elle est peu liée aux protéines, ne permet pas de conclure à l'absence ou au faible degré de liaison protéinique. Et comme le soulignent WOOD et COOPER (95) : "dans les quelques cas où les résultats obtenus par filtration sur gel et par dialyse équilibrée ont été comparés, il a souvent été trouvé que la filtration sur gel donne des pourcentages de liaison considérablement plus faibles que la dialyse équilibrée. Ceci est probablement dû à la dissociation".

La chromatographie sur gel de Séphadex nous permet donc d'affirmer qu'au moins 10 à 20 % de la quinidine sérique sont liés aux protéines, chez le Chien. Mais il n'est pas exclu que le degré de liaison soit plus élevé, la quinidine pouvant se "décrocher" des protéines au cours de la migration sur Séphadex.

2.2. Etude de la liaison protéinique de la quinidine par électrophorèse sur papier

2.2.1. Principe

Si une substance ajoutée à du sérum est fixée par une fraction protéique, elle aura, à l'électrophorèse, la mobilité de cette dernière. Cette méthode renseigne donc sur la spécificité de l'interaction.

2.2.2. Méthode

Nous avons étudié la liaison protéine-quinidine, d'une part sur des sérums de chiens chargés en quinidine (10 et 30 $\mu\text{g/ml}$) et mis à incuber à 37° pendant 1h 30, d'autre part sur des sérums de chiens ayant reçu par voie I.V. une dose toxique de quinidine.

Pour la réalisation de nos électrophorèses sur papier, nous employons le matériel Elphor (cuves et densitomètre). Deux solutions-tampon de pH différent sont utilisées : tampon phosphate 0,15 M, de pH 7,40 et tampon barbital sodique, de force ionique 0,1, de pH 8,6 (96). Les dépôts (20 μl) sont effectués du côté de la cathode ; le temps de migration est environ de 12h, à 21°.

Nous effectuons simultanément six migrations sur six bandes (Schleicher et Schüll n° 2043) :

1	solution aqueuse de quinidine	: bande témoin destinée au dosage
2	sérum contenant de la quinidine	: bande révélée au Vert Sulfo (Vert Lumière)
3	" " " " "	: bande destinée au dosage
4	" " " " "	: bande révélée
5	" " " " "	: bande destinée au dosage
6	" " " " "	: bande révélée

Les électrophorégrammes 2, 4, 6 après révélation sont lus et enregistrés au moyen de l'intégraphe Elphor. Ils permettent de contrôler la migration des protéines des

bandes 3 et 5 destinées au dosage. Ces dernières sont découpées en bandelettes d'un cm, parallèlement au trait de dépôt (figure ci-dessous). Chaque bandelette, elle-même recoupée en petits fragments, est introduite dans un tube à centrifuger contenant 3 ml de H_2SO_4 0,1 N . Après agitation de 30 mn et centrifugation, la quinidine est dosée par lecture directe de la fluorescence (λ_{exc} : 355 nm - λ_{fluo} : 461 nm) .



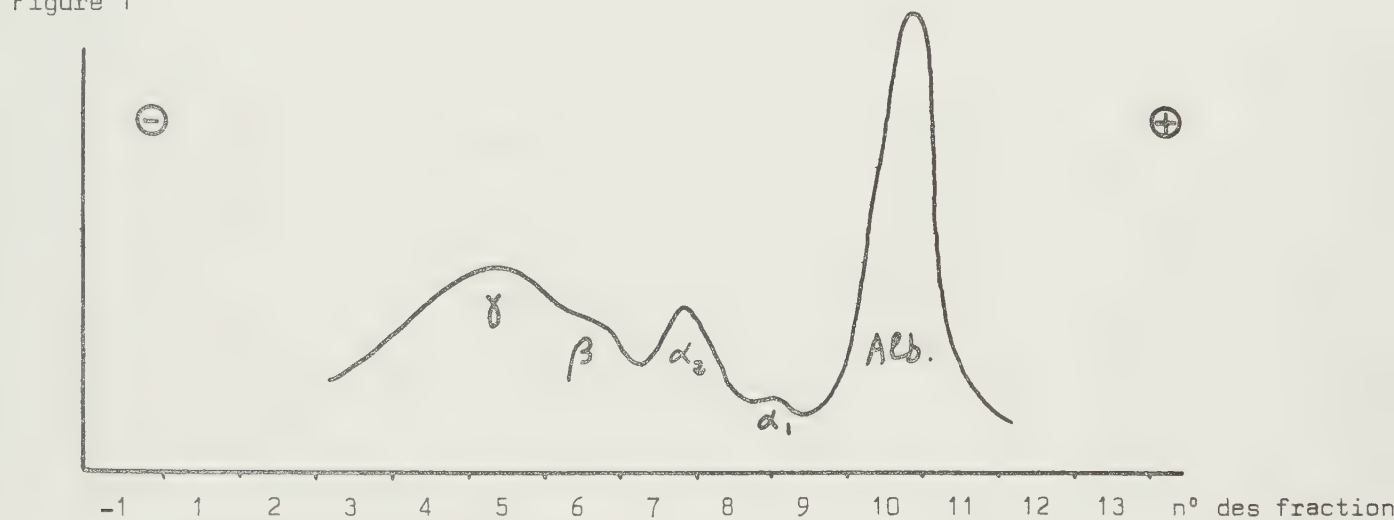
2.2.3. Résultats

Nos résultats sont consignés dans six tableaux. Chacun d'entre eux est explicité par une figure où sont portés le protéinogramme, la migration de la quinidine en solution aqueuse et la migration de la quinidine sérique.

Tableau I Sérum de chien chargé en quinidine - 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - dépôt 20 μl soit 0,2 μg -
Migration en tampon barbital sodique

Fractions n°	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Quinidine (μg)														
(bande témoin	0,04	0,15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1ère bande sérum	0	0,07	0,10	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2ème bande sérum	0	0,12	0,06	0,01	0	0	0	0,015	0	0	0	0	0	0

Figure 1



μg de quinidine
par fraction

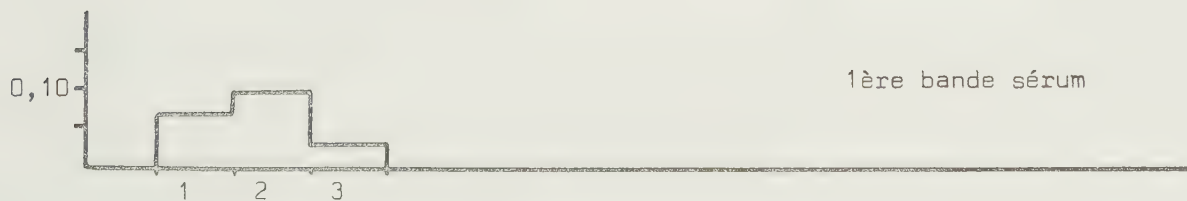
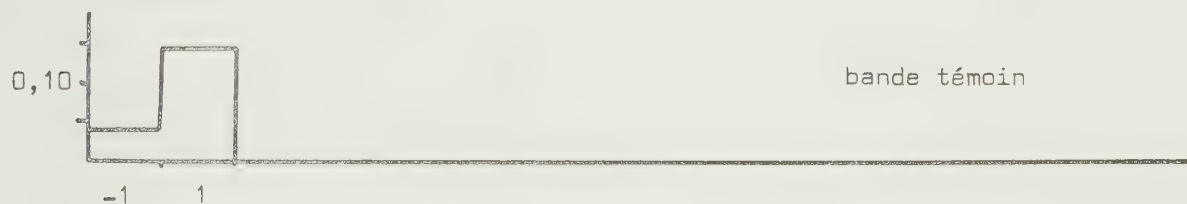
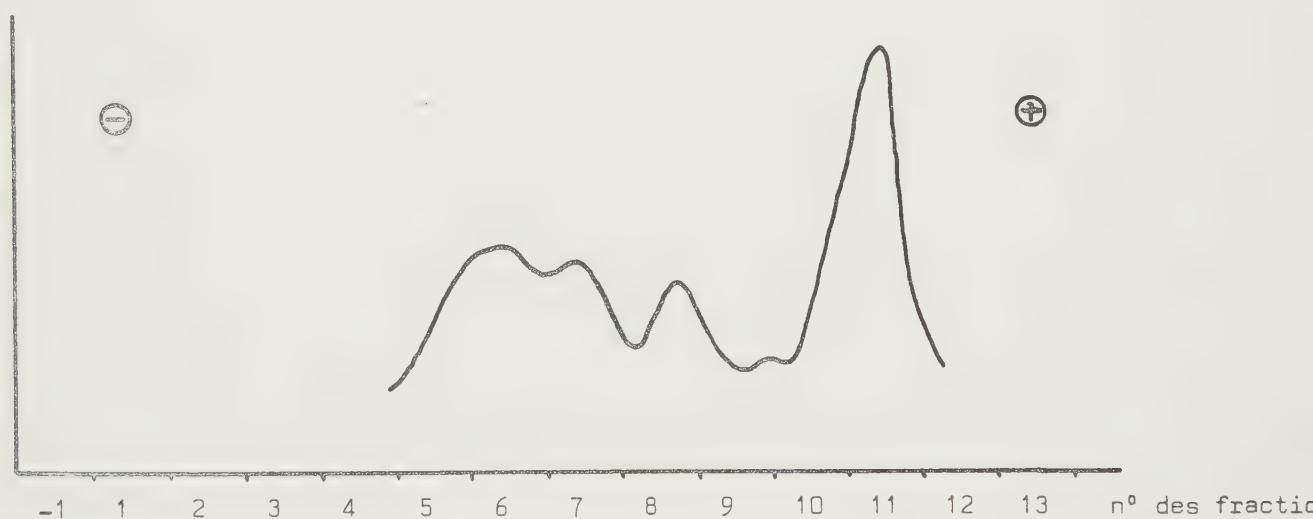


Tableau II

Sérum de chien chargé en quinidine - 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - dépôt 20 μl soit 0,6 μg
Migration en tampon barbital sodique

Fractions n°	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
(bande témoin	0,50	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Quinidine { 1ère bande sérum	0,17	0,33	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
{ 2ème bande sérum	0,02	0,23	0,25	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Figure 2



μg de quinidine
par fraction

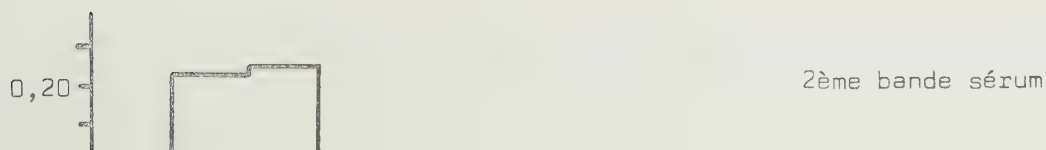
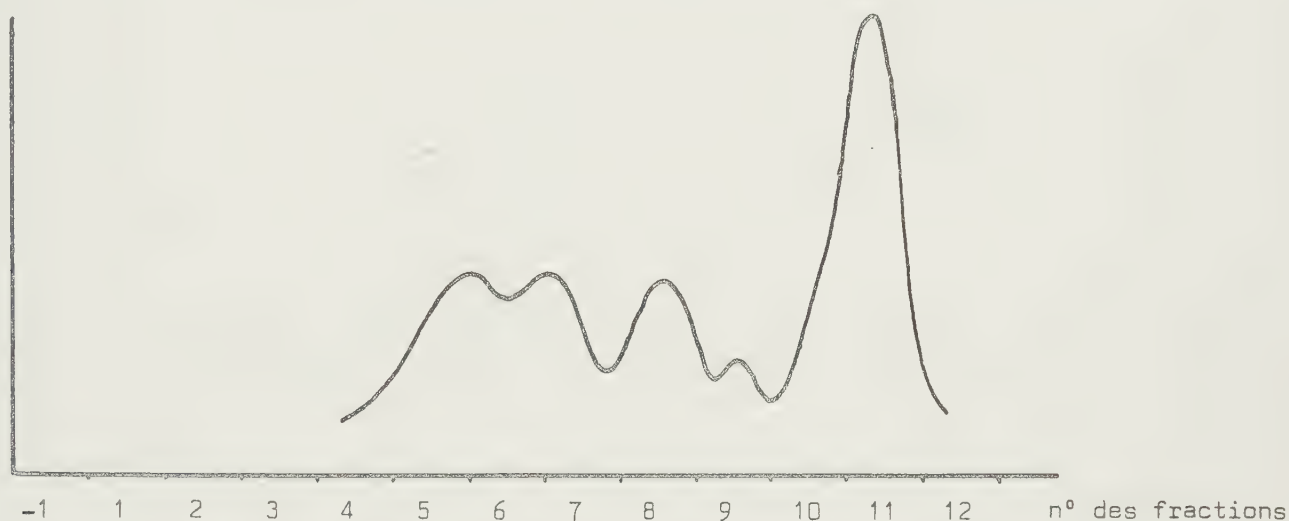


Tableau III Sérum de chien intoxiqué - quinidinémie 11 $\mu\text{g/ml}$ - dépôt 20 μl -
Migration en tampon barbital sodique

Fractions n°	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
(bande témoin	0,15	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Quinidine { 1ère bande sérum	0,01	0,085	0,06	0,015	traces	0	0	0	0,03	0	0	0
{ 2ème bande sérum	0,045	0,065	0,035	0,015	0,01	traces	traces	0	0	0	0	0

Figure 3



μg de quinidine
par fraction



Tableau IV Sérum de chien chargé en quinidine - 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - dépôt 20 μl -
Migration en tampon phosphate

Fractions n°	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Quinidine { bande témoin	traces	0,15	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
{ bande sérum	0	0,08	0,08	0,02	0,01	0,02	0,01	0	0	0	0	0	0

Figure 4

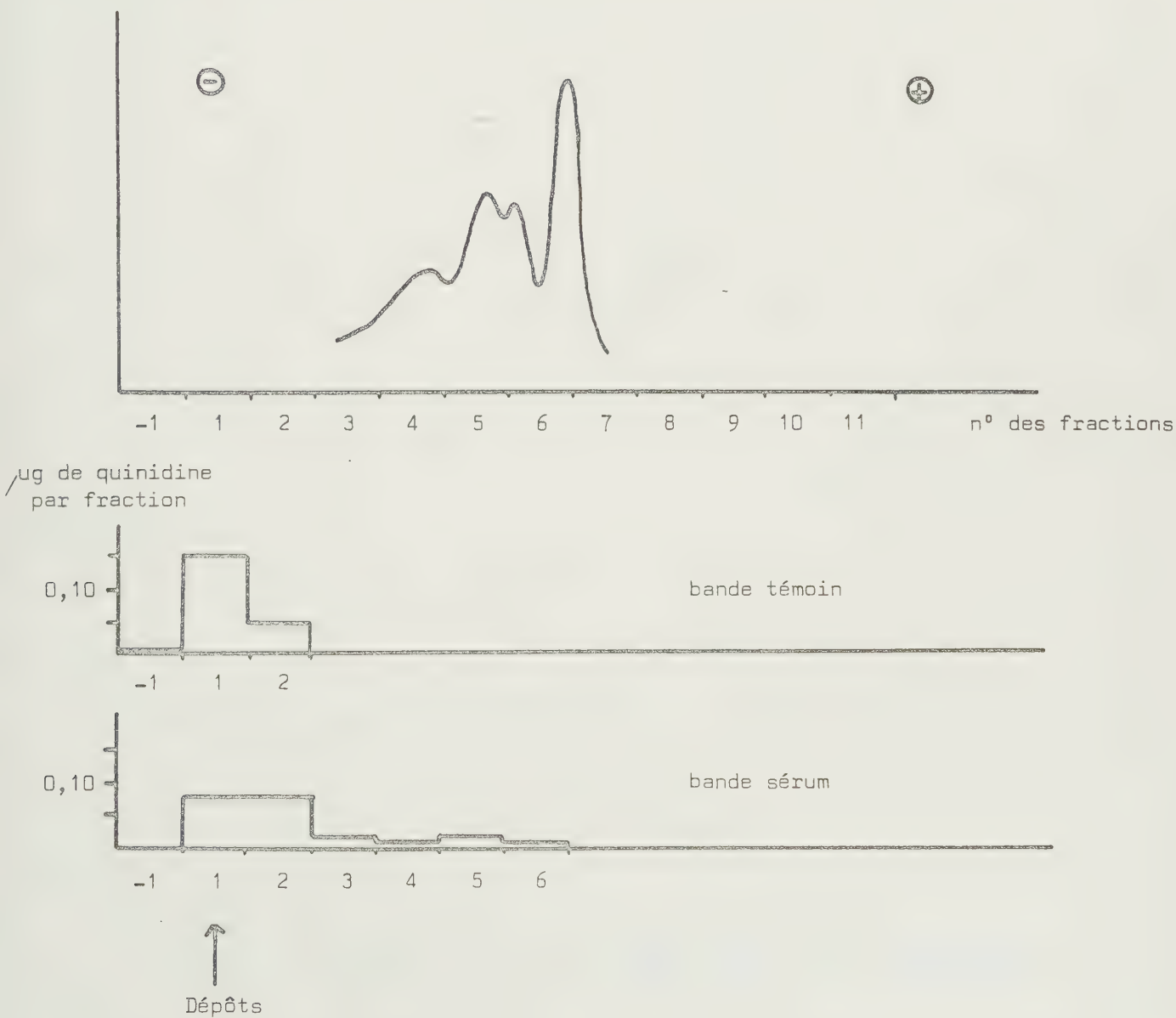
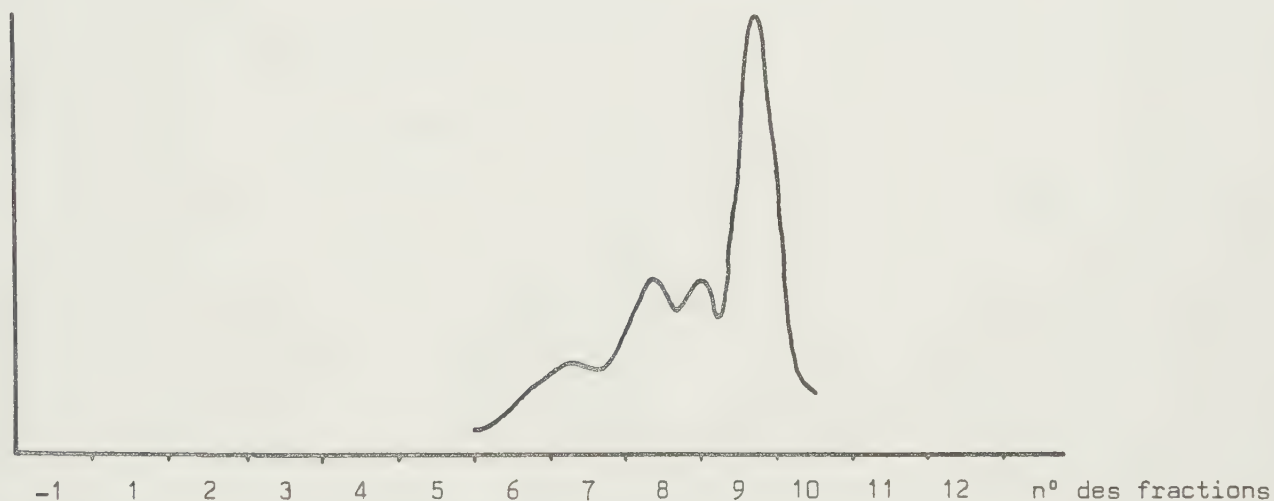


Tableau V Sérum de chien chargé en quinidine - 30 $\mu\text{g/ml}$ - dépôt 20 μl -
Migration en tampon phosphate

Fractions n°	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
(bande témoin	0	0,065	0,50	0,015	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Quinidine { 1ère bande sérum	0	0,18	0,36	0,02	0	0	0	0	0,03	0,04	0	0	0
{ 2ème bande sérum	0	0	0,2	0,4	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0

Figure 5



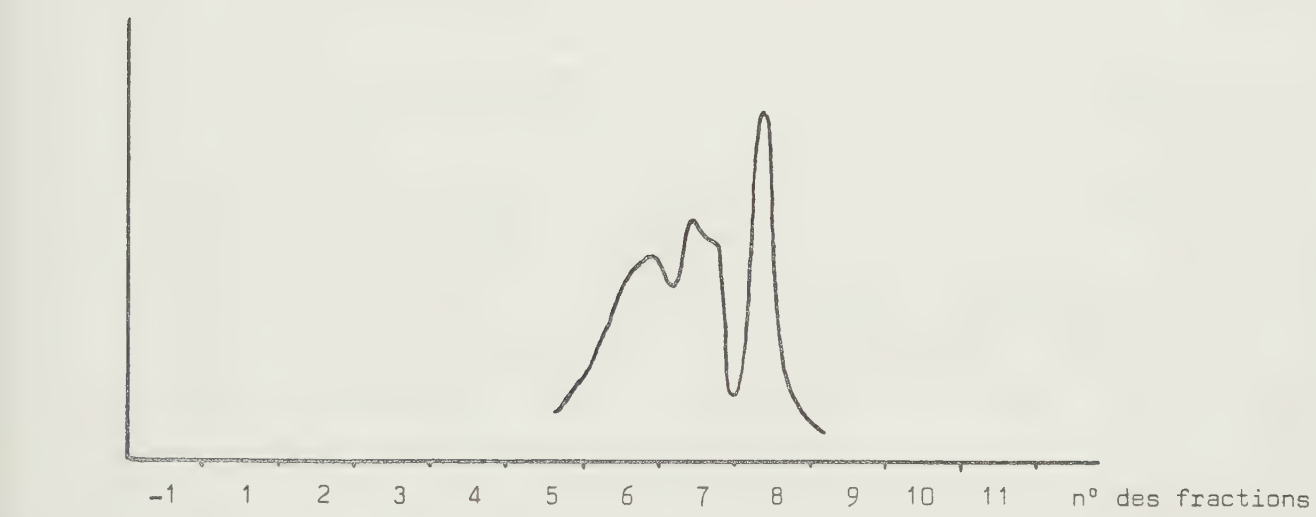
μg de quinidine
par fraction



Tableau VI Sérum de chien intoxiqué - Quinidinémie 11 $\mu\text{g/ml}$ -
Migration en tampon phosphate

Fractions n°	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Quinidine { bande témoin	0	0,15	0,06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
{ bande sérum	0	0	0	0,195	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0

Figure 6



μg de quinidine
par fraction



↑
Dépôts

2.2.4. Discussion

En tampon barbital sodique, pour les sérums chargés en quinidine, il n'y a pratiquement pas d'alcaloïde migrant au niveau des protéines (fig. 1 et 2). Il faut cependant constater que la migration de la quinidine sérique est plus importante que celle du témoin.

Ceci est sensiblement plus net pour la quinidine contenue dans le sérum d'un chien intoxiqué. Dans ce cas, une fraction de l'alcaloïde - moins de 10 % - migre au niveau des globulines (fig. 3) .

En tampon phosphate, les résultats ne sont pas très homogènes. La quinidine, en présence de protéines, migre plus loin que celle du témoin (fig. 5 et 6), mais pour une faible part au niveau des protéines : toujours moins de 20 %. Il ne semble pas y avoir de liaison préférentielle.

Donc, à pH 7,4 ou 8,6 , la quinidine ne migre pas ou très peu - moins de 20 % - au niveau des protéines. Celles-ci accroissent cependant la migration de l'alcaloïde. Nous concluons qu'il y a liaison entre les protéines et la quinidine, mais que cette liaison, labile, se trouve rapidement rompue au cours de l'électrophorèse. Il nous est impossible de déterminer le degré de liaison et la protéine vectrice de la quinidine.

3. CONCLUSION

L'électrophorèse sur papier et la chromatographie sur gel de Séphadex nous permettent d'objectiver une liaison entre les protéines sériques du chien et la quinidine : 10 à 20 % au moins de quinidine sont liés. Il n'est pas exclu que le degré de liaison soit plus élevé, mais nos études démontrent que cette liaison est labile et se trouve presque totalement rompue au cours de la migration électrophorétique des protéines.

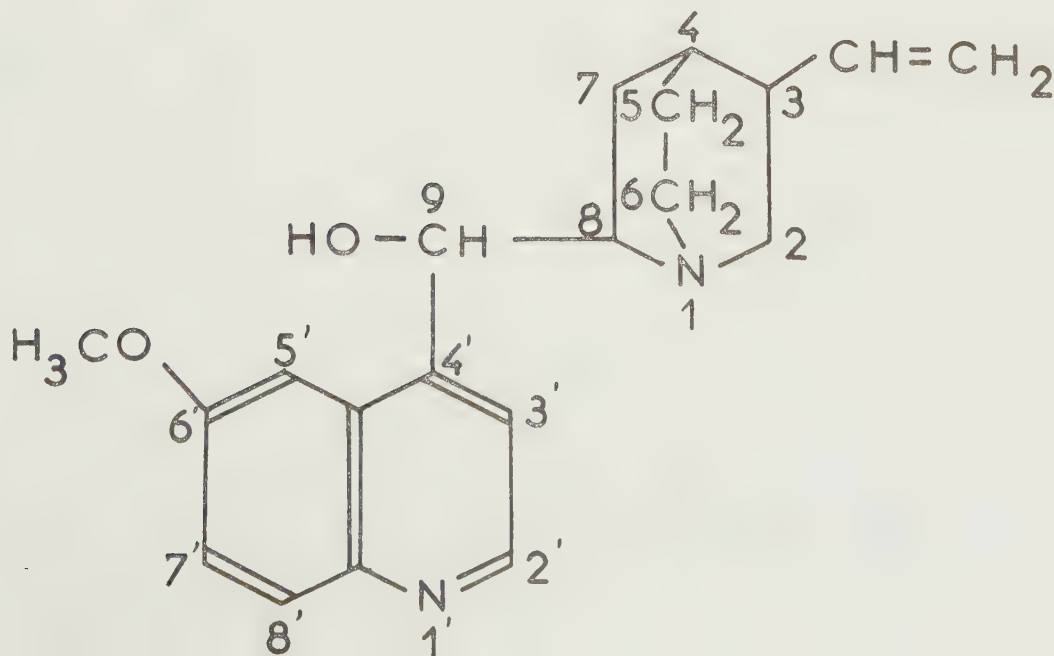
L'interaction protéine-quinidine modifie certainement peu les propriétés pharmacologiques et le métabolisme de la quinidine. Elle ne peut être un obstacle au passage du principe actif du sang dans les tissus et ne doit pas entraver son excrétion urinaire.

METABOLITES URINAIRES DE LA QUINIDINE

1. TRAVAUX ANTERIEURS

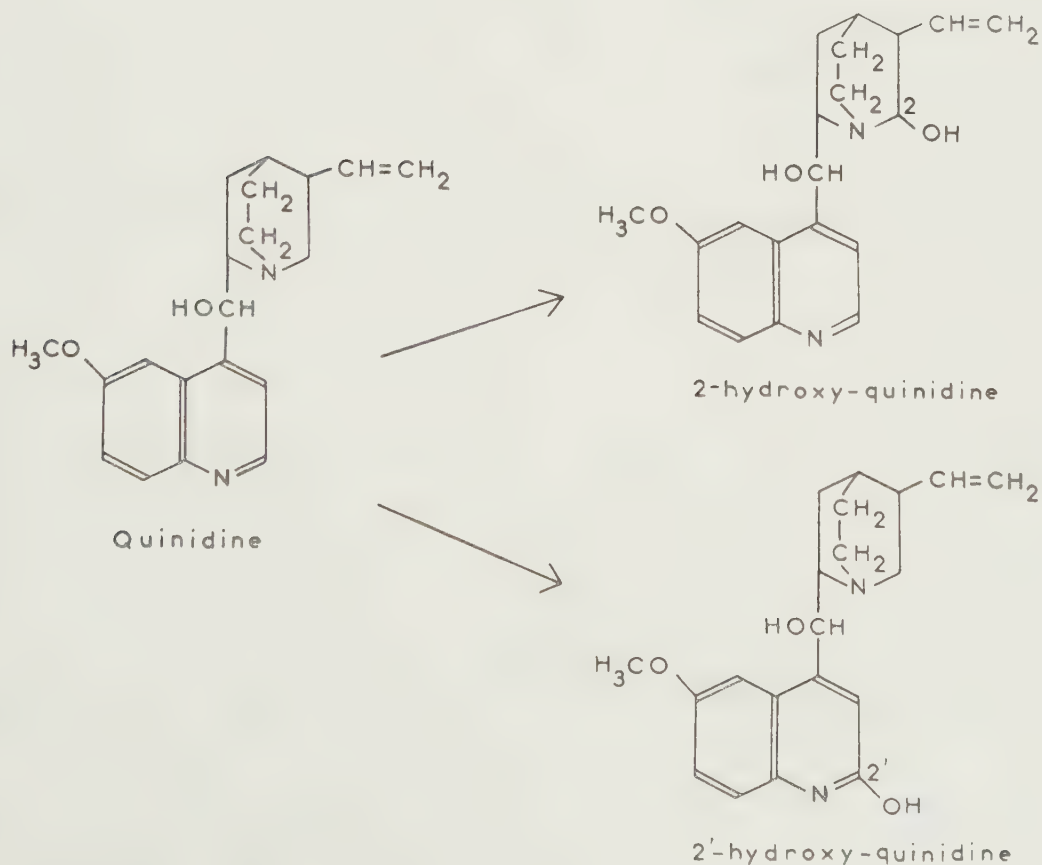
Les transformations chimiques subies par la quinidine, in vivo ou in vitro, au contact d'homogénéisats tissulaires, n'ont pas suscité de très nombreux travaux. Ainsi, de 1945 à nos jours, nous n'avons trouvé dans la littérature que 4 publications consacrées à cette question. Et encore, 3 de ces publications sont antérieures à 1952. De même, la quinine a été peu étudiée, quant à ses transformations métaboliques.

Les métabolites de la quinine et de la quinidine étant, semble-t-il, voisins, nous mentionnerons les travaux qui se sont attachés à ces deux alcaloïdes. Mais auparavant, pour la bonne compréhension de l'exposé, rappelons la formule de la quinidine et la numérotation des atomes qu'a introduite RABE (97).



En 1944, MEAD et KOEPFLI (98) identifient un métabolite de la quinine, la 2'-hydroxy-quinine, métabolite formé au cours de l'incubation à 38° de foie de lapin et de quinine. Ce composé avait été précédemment isolé par KELSEY (99).

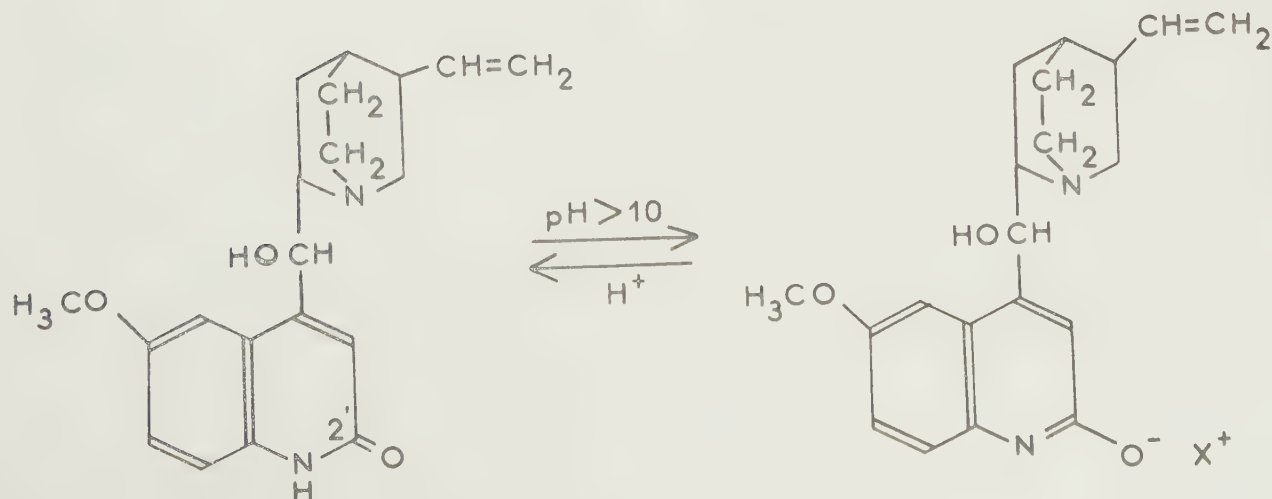
Ultérieurement BRODIE, BAER et CRAIG (100,101), à partir d'urine humaine et par distribution à contre-courant (méthode de CRAIG) isolent 3 métabolites. Un seul, de nature phénolique est identifié, d'une manière certaine selon les auteurs : la 2'-hydroxy-quinidine, encore appelée carbostyryl de la quinidine. Le deuxième aurait un atome d'oxygène lié au noyau quinuclidique (2-hydroxy-quinidine ?), tandis que le troisième serait bi-oxygéné. Les deux premiers de ces métabolites ont été également obtenus, in vitro, par FRASER et KERMACK (102). BRODIE et Coll. proposent donc, en 1951, le schéma suivant du métabolisme de la quinidine, chez l'Homme :



Selon CONN (5) (1964) qui a étudié chez l'Homme, le Chien, le Lapin, les métabolites urinaires de la quinidine par administration de la molécule marquée au tritium, 20 à 50 % de la radioactivité totale de l'urine sont représentés par la quinidine, 20 à 30 % par la 2'-hydroxy-quinidine, 30 à 40 % par le métabolite hydroxylé non phénolique, 5 à 10 % par d'autres métabolites. Signalons que CONN ne décrit pas avec précision le protocole qu'il a suivi.

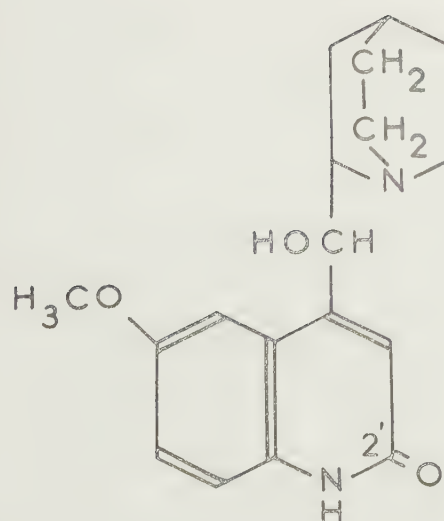
Le seul travail analytique concernant l'étude des métabolites de la quinidine, qui ait fait appel aux méthodes les plus modernes (spectrophotométrie U.V. et I.R., R.M.N., spectrométrie de masse, chromatographie en couches minces, chromatographie gazeuse ...) est à l'actif de PALMER et Coll. (103). Mais les résultats obtenus sont un peu décevants et n'ont pas permis d'améliorer sensiblement la connaissance du métabolisme de la quinidine.

Ces auteurs ont administré chez l'Homme du gluconate de quinidine, contaminé d'ailleurs à 20-30 % par une impureté inconnue. A partir des urines, ils ont pu isoler un certain nombre de métabolites. Deux de ceux-ci ont été très étudiés ; ils sont en $C_{20}H_{24}N_2O_3$, ont une masse moléculaire de 340,178 alors que la quinidine est en $C_{20}H_{24}N_2O_2$, masse moléculaire 324,41. Ils correspondent donc à de la quinidine ayant 1 atome d'oxygène supplémentaire. Pour l'un de ces métabolites l'atome d'oxygène est fixé sur le noyau quinoléique, en 2'. PALMER lui attribue la structure d'une 2-quinolone, quinolone qui s'énolise facilement en milieu alcalin :

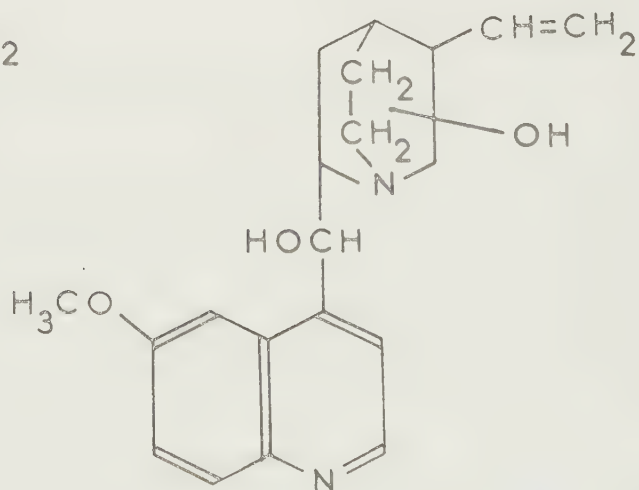


Pour le second métabolite, l'oxygène fait partie d'un groupement hydroxyle greffé sur le noyau quinuclidique, mais dans une position qui n'a pu être précisée. D'autres métabolites - en particulier des métabolites polyoxygénés - sont signalés par PALMER et Coll. qui n'ont pu cependant leur donner une structure. De plus, certains métabolites seraient sous forme de β -glucosiduronates.

En conclusion, les métabolites urinaires de la quinidine sont nombreux et imparfaitement connus. Ils sont à l'état libre ou pour une faible part, sous forme de β -glucosiduronates. Deux métabolites ont été isolés et caractérisés, représentant deux modifications oxydatives de la quinidine. Ils dérivent l'un de la 2'-quinolone (A), l'autre de l'hydroxy-quinidine (B). Des composés polyoxygénés ont été également isolés.



A



B

2. TRAVAUX PERSONNELS

Nous nous proposons d'identifier les métabolites urinaires de la quinidine, chez le Chien. Une telle étude peut se décomposer en trois étapes. Il faut tout d'abord isoler globalement les métabolites, puis séparer chaque métabolite et enfin l'identifier.

A l'heure actuelle, la première étape est franchie ; nous en sommes à l'isolement de chaque métabolite.

Pour l'isolement global des métabolites, nous utilisons les Sephadex G-10 et les extractions par solvant organique.

La séparation des métabolites et leur isolement mettent en jeu la chromatographie préparative sur couches minces.

L'identification sera obtenue grâce à la spectrométrie U.V. et I.R., la spectrofluorimétrie et la spectrométrie de masse.

2.1. Recueil des urines destinées à l'étude de métabolisme

Deux chiens (A et B), de 16 et 20 kg, sont anesthésiés au chloralose. Leurs urethères sont cathétérisés et des urines témoin prélevées. Ils reçoivent par voie intraveineuse, en perfusion lente, 12 mg/kg de quinidine-base. Sous perfusion et après celle-ci, les urines sont recueillies dans un flacon placé dans la glace et entouré de papier noir. Ces urines sont congelées et conservées à -18°C .

Les urines de ces deux chiens ont été soumises séparément au même protocole d'analyses.

Nous avons cherché à adapter une méthode d'isolement de la quinidine et de ses métabolites urinaires, en vue d'une séparation chromatographique ultérieure. Le plus simple consistait à procéder à une extraction directe de l'urine par un solvant organique. Cette méthode ne nous ayant pas pleinement satisfait, nous avons par la suite fait appel aux Sephadex.

2.2. Extraction par un solvant organique, avant et après hydrolyse enzymatique, des métabolites urinaires de la quinidine

2.2.1. Principe

Nous étudions les métabolites urinaires de la quinidine, d'une part par des dosages de quinidine et de ses métabolites, d'autre part, par des chromatographies en couches minces (CCM), dosages et CCM étant effectués avant et après hydrolyse enzymatique de l'urine. Toutes les extractions sont pratiquées par le chloroforme en milieu alcalin.

2.2.2. Méthode

Dans deux petits flacons à bouchon rodé, sont placés :

flacon "témoin" : 3 ml d'urine + 1 ml de tampon acéto-acétique de pH 5,2

flacon "hydrolyse" : 3 ml " + 0,9 ml " " " " "

+ 0,1 ml de suc d'Hélix pomatia* (soit 10 000 unités de β -glycuronidase et 80 000 unités de sulfatase).

Le flacon "témoin" est placé à + 4° , le flacon "hydrolyse" à 38°

Après 24 h, dans chaque flacon, sur 1 ml, nous dosons la quinidine et ses métabolites selon la méthode précédemment décrite, à 2 exceptions près cependant. Le solvant extractif est le chloroforme, solvant dont l'utilisation rend mieux compte de la richesse en métabolites ; d'autre part, il n'est pas procédé à un lavage alcalin de la phase organique d'extraction.

* Suc d'Hélix pomatia stabilisé - Industrie Biologique Française - 92-GENEVILLIERS

Sur le restant, après alcalinisation, nous extrayons quinidine et métabolites, par le chloroforme, au moyen d'une agitation de 30 mn. La phase chloroformique, centrifugée, est isolée et évaporée au bain-marie, à 45°, sous courant d'azote.

Le résidu repris par CHCl_3 , est soumis à l'analyse qualitative par chromatographie bidimensionnelle en couches minces, sur gel de silice (Kieselgel G Merck n° 7731) : épaisseur du support 0,5 mm. Les solvants utilisés sont, dans la première dimension méthanol (parcours de migration 13,5 cm), dans la deuxième dimension chloroforme/acétone/diéthylamine 5/4/1 (parcours de migration 12,5 cm). Afin de pouvoir comparer les chromatogrammes et juger ainsi l'effet de l'hydrolyse enzymatique, les dépôts, de l'ordre de 60 μg , sont identiques sur les deux CCM (avant et après hydrolyse). Des dépôts témoin de quinidine et d'hydroquinidine sont également effectués.

Les chromatogrammes sont révélés, après pulvérisation d'acide sulfurique 0,5 N, sous U.V. à 350 nm .

2.2.3. Résultats

Les dosages ont donné les résultats suivants :

	avant hydrolyse $\mu\text{g/ml}$ d'urine	après hydrolyse $\mu\text{g/ml}$ d'urine
Chien A	250	270
Chien B	183	170

L'hydrolyse, inopérante dans un cas, libère dans l'autre cas 8 % de métabolites fluorescents.

La figure ci-après (fig. 1) représente l'aspect du chromatogramme. Ce dernier ne semble pas modifié lorsque l'urine a été soumise à l'hydrolyse : pas de spot supplémentaire - pas de différence sensible dans l'intensité des spots.

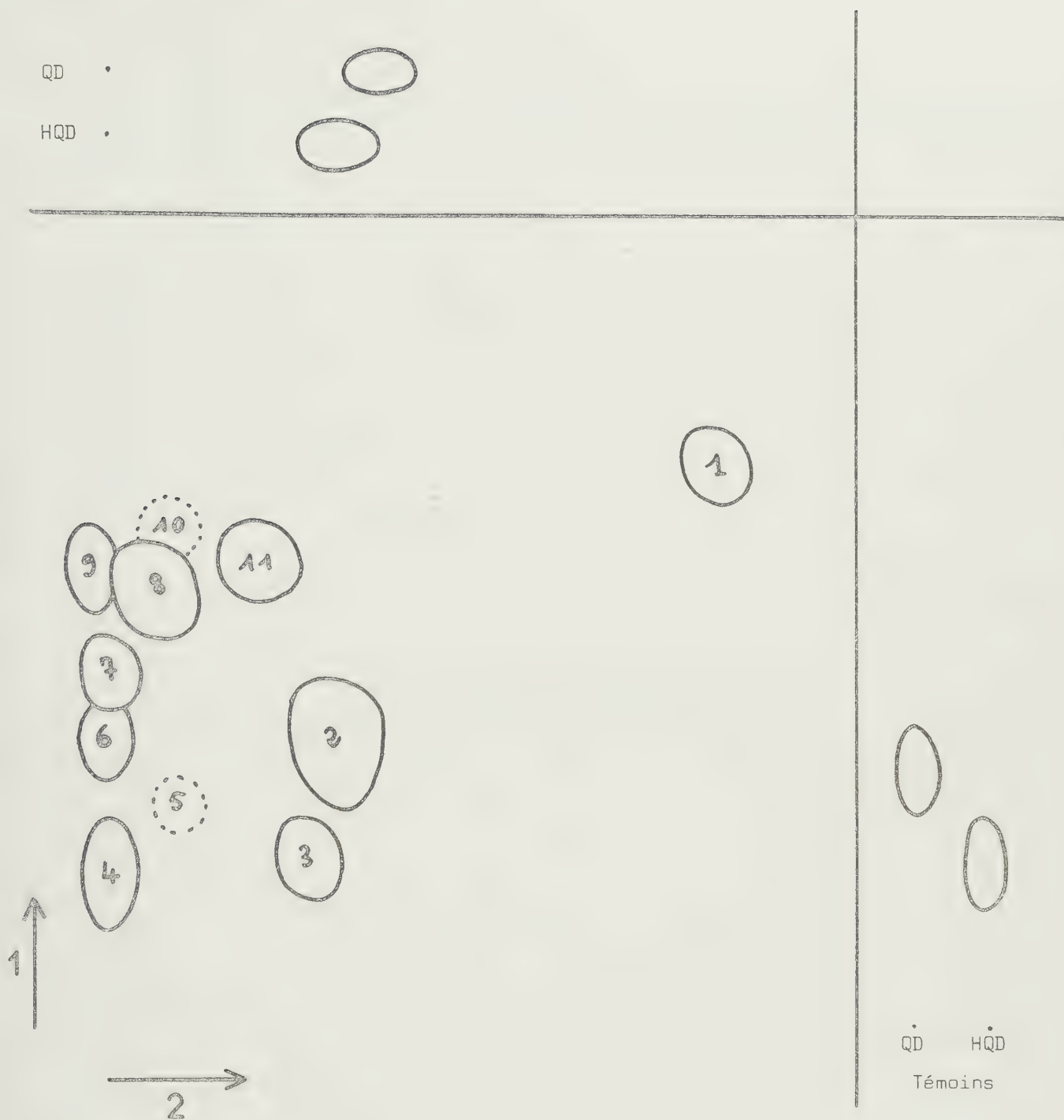


Fig. 1 Chromatogramme urinaire après extraction directe chloroformique
 Dépôt de 60 μ g environ, exprimé en quinidine-base
 Révélation sous U.V. (350 nm), après pulvérisation d' H_2SO_4 0,5 N

QD quinidine

HQD hydroquinidine

Onze taches présentant toutes une fluorescence bleue, apparaissent sur le chromatogramme ; parmi celles-ci, on remarque la quinidine (spot n° 2) et l'hydroquinidine (n° 3).

L'hydroquinidine est, comme nous l'avons vu au chapitre premier, une impureté renfermée par la quinidine que nous utilisons.

Deux spots (n° 5 et 10) sont à l'état de traces, tandis que les spots 4 et 8 semblent, d'après leur importance, les métabolites majeurs de la quinidine. Mais les spots 6, 7 et 9 ne sont pas à négliger pour autant. Au niveau du spot 7, le recouvrant partiellement, on rencontre une tache importante, qu'indique une fluorescence jaunâtre ; elle est également visible sur la CCM effectuée à partir d'urines témoin provenant de nos chiens. Il ne s'agit donc pas d'un métabolite de la quinidine. D'autres petites taches "suspectes" sont également présentes.

Tableau I Composition de l'extrait chloroformique urinaire

Composé n°	Intensité approximative des taches exprimée en croix	R _F dans les solvants	
		1* et	2**
1	+	0,64	0,76
2 quinidine	+++++	0,33	0,35
3 hydroquinidine	++	0,18	0,29
4	+++	0,17	0,00
5	traces	0,25	0,11
6	+ à ++	0,33	0,00
7	++	0,42	0,00
8	+++	0,52	0,08
9	+ à ++	0,55	0,00
10	traces	0,62	0,12
11	traces à +	0,54	0,24

* Solvant 1 méthanol

** " 2 chloroforme/acétone/diéthylamine 5/4/1

Les R_F ne sont donnés qu'à titre indicatif. En effet, ils sont influencés par :

- la distance de migration,
- la quantité de substance déposée (55 à 60 μg dans nos cas),
- et surtout la présence ou l'absence d'autres composés (métabolites ou constituants normaux de l'urine) .

Plus intéressant est l'aspect général du chromatogramme, i.e. la position des spots les uns par rapport aux autres.

Il est certain que le chloroforme, solvant polaire, extrait bon nombre de constituants normaux de l'urine, qui perturbent la migration et qui plus est, gêneront la suite de notre protocole analytique, lorsque, dans la phase préparative, nous isolerons par grattage les métabolites. Aussi, avons-nous cherché à adapter une autre méthode d'isolement. A la suite des travaux de VALLON (104) dans notre laboratoire, nous avons été amené à utiliser les Sephadex G-10 .

2.3. Isolement chromatographique de la quinidine et de ses métabolites urinaires, sur Sephadex G-10

2.3.1. Principe de l'utilisation des Sephadex G-10

Précédemment, nous avons utilisé les Sephadex G-25 pour séparer la quinidine libre de la quinidine liée aux protéines.

Mais les Sephadex peuvent, comme l'a montré GELOTTE (105), adsorber dans certaines conditions de pH et de force ionique, des composés aromatiques ou hétérocycliques, de même que des substances à caractère basique. Cette adsorption peut être faible, facilement réversible ; le déplacement dans la colonne chromatographique est alors simplement ralenti. Si l'adsorption est forte, elle peut présenter un certain caractère d'irréversibilité, qui fait que la filtration n'a plus lieu ; mais cette irréversibilité n'est pas définitive et peut cesser, si l'on modifie par exemple le pH du système d'élution.

Pour notre part, nous avons étudié et utilisé les propriétés adsorbantes des Sephadex pour isoler la quinidine et ses métabolites urinaires.

2.3.2. Matériel et méthode

. La colonne chromatographique - les dépôts effectués - le système éluant

Notre étude a été conduite sur colonne de Sephadex G-10 :
caractères de la colonne : longueur 30 cm ; diamètre 1,5 cm
caractères du Sephadex : taille des particules : 40 à 120 μ ; eau de gonflement : 2 g/g de gel sec ; volume occupé par le gel : 2-3 ml/g de gel sec ; limite d'exclusion du gel exprimée en masse moléculaire : 700 .

Le Sephadex est équilibré pendant 3-4 h, sous agitation, contre 20 fois son volume de soude 0,1 N . On se débarrasse des particules les plus fines par flottation . La colonne remplie sur 25 cm environ de la suspension de Sephadex, n'est utilisée qu'après un délai de 24 heures.

Afin d'étudier le pouvoir d'adsorption du Sephadex vis-à-vis de la quinidine, nous avons dans un premier temps, déposé des solutions alcalines ($\text{pH} > 10$) de quinidine : solutions aqueuses et urines chargées. Dans un deuxième temps, nous avons soumis à la filtration sur gel l'urine de nos chiens intoxiqués (dépôt de 10 ml environ d'urines alcalinisées, de $\text{pH} > 10$). Après filtration de notre échantillon, quel qu'il soit, la colonne est lavée par 30 à 40 ml de soude 0,1 N , puis éluee par 100 ml environ d'acide chlorhydrique 0,1 N .

On recueille donc deux fractions : - une fraction alcaline qui correspond à la filtration de l'échantillon et du liquide de lavage. Dans le cas d'un dépôt urinaire, cette fraction est jaunâtre, de la couleur de l'urine mais diluée. -

- une fraction acide d'élution, incolore ; les derniers ml de la fraction alcaline de lavage ont été par précaution joints à cette fraction, car il est difficile de suivre le front de l'éluant.

. Etude des éluats

Lorsque fut testée la capacité d'adsorption de la colonne de Sephadex vis-à-vis de la quinidine, celle-ci fut dosée dans les fractions alcaline et acide, selon la méthode décrite au chapitre II .

Lorsque furent déposées les urines destinées à l'étude de métabolisme, le protocole analytique suivant fut adopté.

Dans deux flacons à bouchon rodé, sont placés :

flacon "témoin" : 5 ml de la fraction alcaline + 2 ml de tampon acéto-acétique de pH 5,2

flacon "hydrolyse" : 5 ml de la fraction alcaline + 1,8 ml de tampon acéto-acétique de pH 5,2 + 0,2 ml de suc d'Hélix pomatia

Nous procédons de même pour la fraction acide d'élution.

Les flacons "témoin" sont placés à + 4°, les flacons "hydrolyse" à 38°, pendant 24h.

Le protocole reprend ensuite celui décrit précédemment (cf 2.2.2. Méthode) .

2.3.3. Résultats

2.3.3.1. Pouvoir d'adsorption des Sephadex vis-à-vis de la quinidine en solution aqueuse

Dépôt (μ g) de l'ordre de	100	1800	8000
Quantité retrouvée (μ g) dans la fraction alcaline	0,5	0,65	3,90
Quantité retrouvée (μ g) dans la fraction acide	93	1730	7811
Rendement de l'élution acide	99,5	99,9	99,9

2.3.3.2. Pouvoir d'adsorption des Sephadex vis-à-vis de la quinidine en solution dans l'urine

Dépôt (μ g) de l'ordre de	100	2000	8000
Quantité retrouvée (μ g) dans la fraction alcaline	1,4	0,54	4,12
Quantité retrouvée (μ g) dans la fraction acide	107	2030	8202
Rendement de l'élution acide	98,7	99,9	99,9

La quinidine est adsorbée par les Sephadex G-10 en milieu alcalin et éluee en milieu acide. La fraction non adsorbée est toujours inférieure à 1,5 %. On peut affirmer que la quinidine est quantitativement fixée par le Sephadex G-10 en milieu alcalin et quantitativement éluee en milieu acide. Il faut également insister sur l'importante capacité d'adsorption des Sephadex : au moins égale à 8 mg pour une colonne de 1,5 cm de diamètre renfermant du Sephadex sur une hauteur de 25 cm environ. La force ionique du milieu ne semble pas affecter l'adsorption en milieu alcalin, car les résultats sont identiques, que la quinidine soit en solution aqueuse pure ou ajoutée à de l'urine.

2.3.3.3. Protocole sur Sephadex appliqué à l'étude du métabolisme urinaire de la quinidine

Les dosages effectués avant et après hydrolyse sur les fractions alcaline et acide ont donné les résultats suivants :

		avant hydrolyse /ug	après hydrolyse /ug	rendement de l'hydrolyse %
<u>chien A</u>	fraction alcaline	563	706	+ 25,4
	fraction acide	1400	1360	- 2,9
<u>chien B</u>	fraction alcaline	258	300	+ 16,4
	fraction acide	1954	1883	- 3,6

La fraction alcaline présente une fluorescence importante (λ_{exc} : 358-360 nm ; $\lambda_{fl.}$: 455-460 nm), correspondant pour les chiens A et B à respectivement 28,6 et 11,6 % du total. Certains métabolites de la quinidine ne sont donc pas adsorbés par les Sephadex en milieu alcalin.

L'hydrolyse de cette fraction est opérante ; en conséquence, des métabolites s'y trouvent sous forme conjuguée.

Par contre, la fraction acide d'élution, la plus importante, n'est pas influencée par l'hydrolyse enzymatique.

. Composition de la fraction alcaline

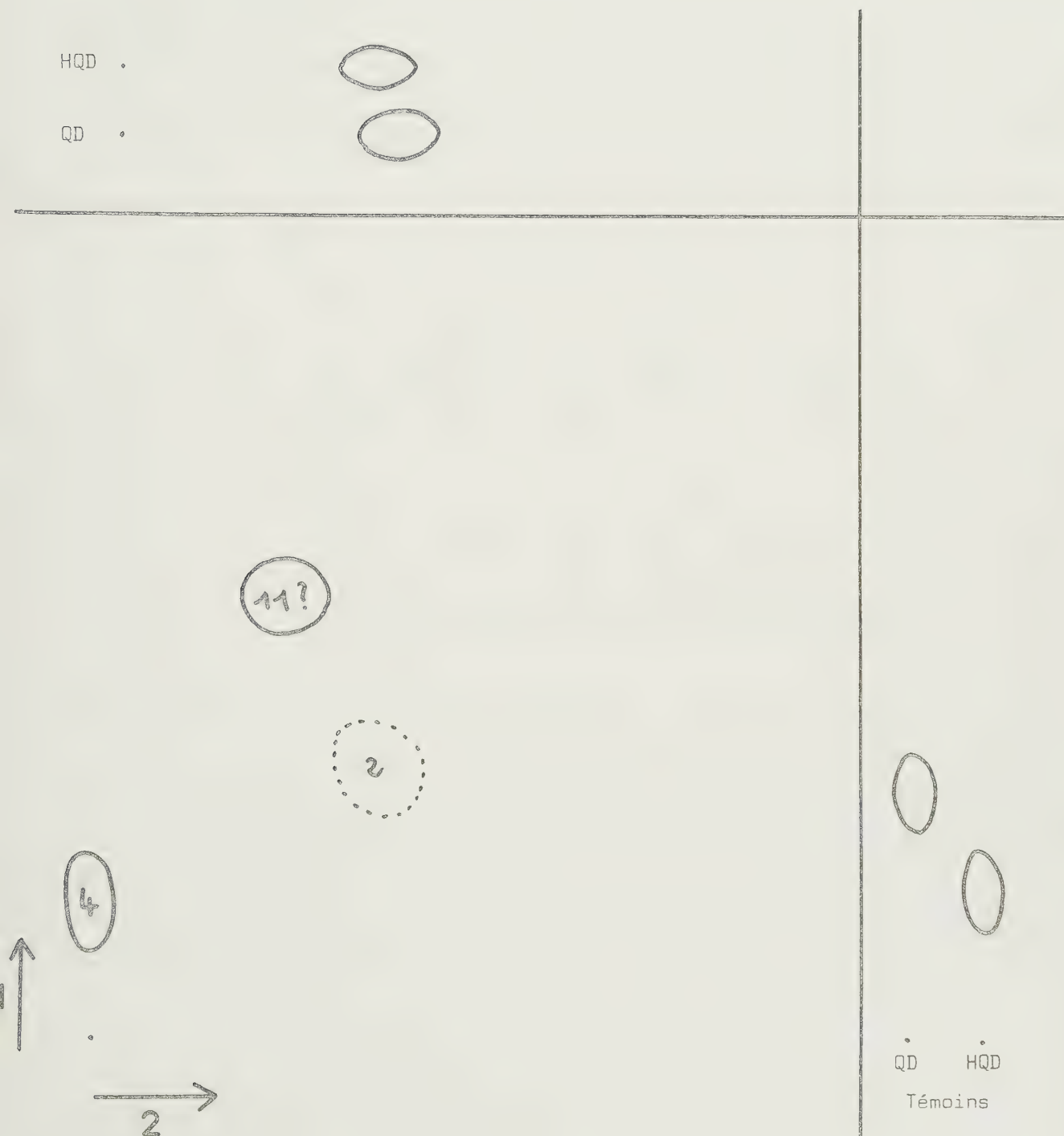


Fig. 2 Chromatogramme de la fraction alcaline (Protocole Séphadex)
Dépôt de 60 μ g environ, exprimé en quinidine-base
Révélation sous U.V. (350 nm), après pulvérisation d' H_2SO_4 0,5 N

Le chromatogramme de la fraction alcaline (fig. 2) présente 3 spots, possédant une fluorescence bleue. L'un de ceux-ci est très important ; il correspond au composé n° 4 du chromatogramme précédent. L'hydrolyse semble accentuer son intensité. Les dosages et les CCM indiqueraient donc que ce composé existe sous forme conjuguée. Les deux autres spots sont la quinidine (à l'état de traces) et le composé n° 11 (?) .

Tableau II Composition de la fraction alcaline

Composé n°	Intensité des taches
2 quinidine	traces à +
4	++++
11 ?	+ à ++

. Composition de la fraction acide d'élution

Le chromatogramme est absolument identique, avant et après hydrolyse (fig.3). Il est très proche de celui obtenu après extraction directe chloroformique (fig. 1). Mais, grâce au protocole Sephadex, les spots sont mieux individualisés et beaucoup plus nets.

Les spots n° 4 et 11 sont très atténués, car étant peu fixés par le Sephadex, ils se retrouvent dans la fraction alcaline.

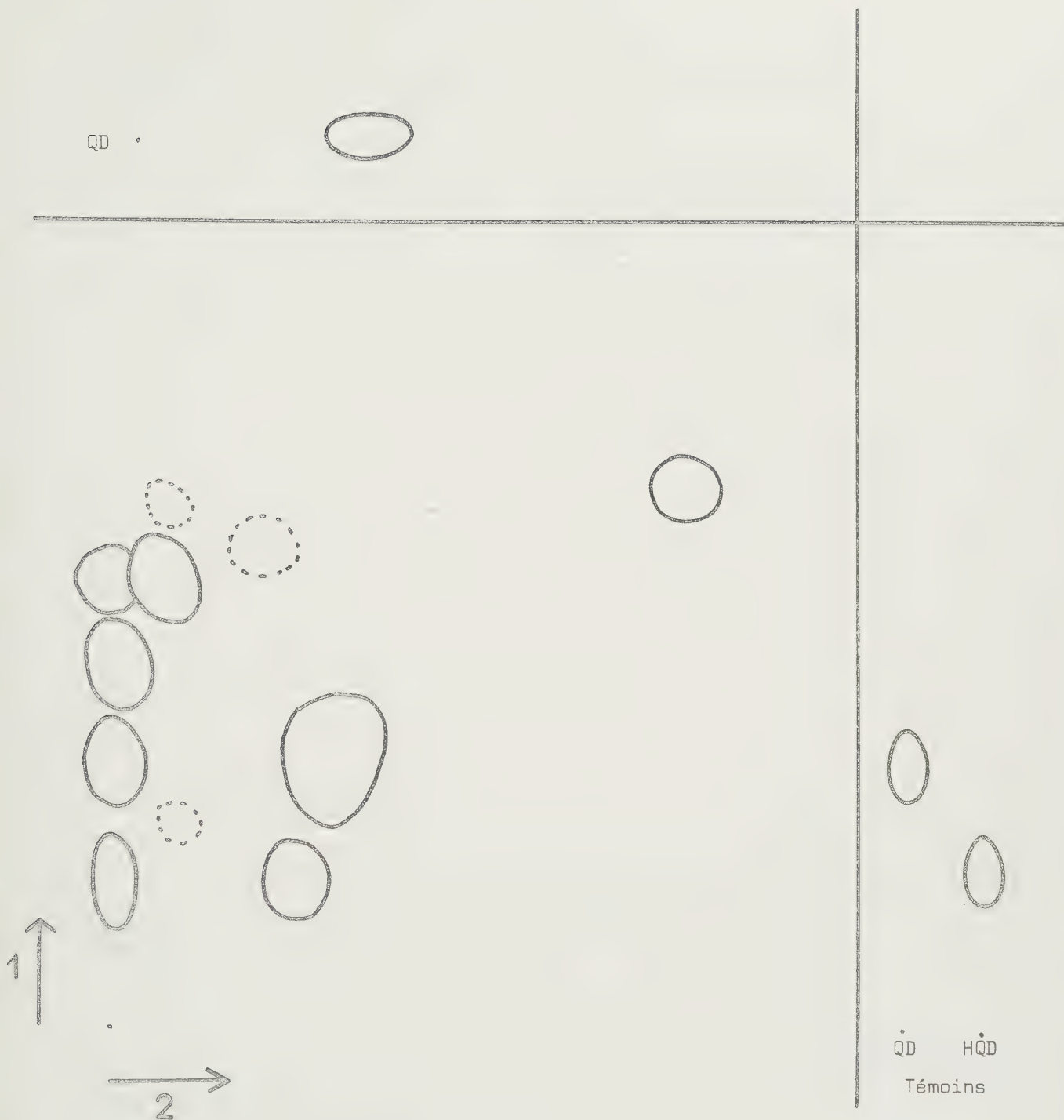


Fig. 3 Chromatogramme de la fraction acide (Protocole Sephadex)
Dépôt de 60 μ g environ, exprimé en quinidine-base
Révélation sous U.V. (350 nm), après pulvérisation d' H_2SO_4 0,5 N

Tableau III Composition de la fraction acide d'élution

Composé n°	Intensité des taches
1	+
2 quinidine	+++++
3 hydroquinidine	++
4	traces à +
5	traces
6	+ à +++
7	++
8	+++
9	+
10	traces
11	traces

2.4. Discussion

Dans une étude de métabolisme médicamenteux, un des buts poursuivis est d'élucider la structure des métabolites urinaires. Cela suppose leur isolement à l'état pur, ce que l'extraction par solvant organique n'autorise pas facilement.

La chromatographie sur Sephadex G-10 permet l'isolement de la quinidine et de ses métabolites. Ce protocole est original ; c'est en effet la première fois à notre connaissance que les propriétés adsorbantes des Sephadex vis-à-vis d'un médicament et de ses métabolites, sont utilisées dans une étude de métabolisme.

Jusqu'à présent, les propriétés adsorbantes des Sephadex avaient été seulement mises à profit pour isoler de l'urine des composés comme les purines, les iodotyrosines, les métanéphrines, les mélanogènes ... (106-111) et éliminer des substances gênantes - sels minéraux, urée, composés aliphatiques divers - qui ne sont pas fixées dans les conditions opératoires choisies.

Quant à nous, nous avons isolé, par la chromatographie sur gel de Sephadex G-10, 9 métabolites de la quinidine, que nous cherchons à identifier. Six de ces 9 métabolites apparaissent plus importants et l'un existerait partiellement sous forme conjuguée. Cependant, parmi ces 9 métabolites, 2 ne sont que peu adsorbés, ce qui nous oblige à conserver la fraction de filtration de l'urine et à pratiquer sur celle-ci des extractions chloroformiques.

3. CONCLUSION

L'utilisation des propriétés adsorbantes des Sephadex G-10 nous a permis d'isoler 9 métabolites de la quinidine dans l'urine de chiens intoxiqués par cet alcaloïde.

Les Sephadex G-10 paraissent avoir un avenir prometteur dans l'isolement des médicaments et de leurs métabolites urinaires. Ils peuvent également trouver des applications en toxicologie analytique dans l'isolement d'alcaloïdes et de composés médicamenteux. Sous certains aspects, cette méthode se rapproche de celle qui fait appel aux résines échangeuses de cations pour fixer certains toxiques urinaires (112-115) .

Chapitre Quatrième

Evolution Clinique et Biologique d'une Intoxication par la Quinidine

Les intoxications aiguës provoquées par l'ingestion de quinidine sont relativement peu fréquentes et rares sont les publications qui en rapportent. Dans la littérature médicale de ces 20 dernières années, 5 cas seulement ont été décrits : 3 par ingestion volontaire (116-118), 2 par ingestion accidentelle chez des enfants (119,120). Sur ces 5 cas, deux se sont terminés fatalement, par défaillance cardiaque.

Les manifestations cliniques que l'on observe dans l'intoxication quinidinique aiguë (121) se classent en :

- manifestations gastro-intestinales : nausées, vomissements, diarrhées ;
- troubles sensoriels, visuels et auditifs : surdité, tintements d'oreilles, vertiges ;
- troubles cardiaques :
 - . troubles de la conduction, tant auriculo-ventriculaire qu'intraventriculaire (allongement de QT et de PR, élargissement du complexe QRS ...) ;
 - . troubles de l'excitabilité ; extrasystoles ventriculaires, tachycardie, fibrillation ventriculaire ;
 - . collapsus cardiovasculaire.

Au cours de ce travail concernant la quinidine, il nous a été donné de suivre une intoxication que nous présentons.

Madame Odette R..., 37 ans, est hospitalisée vers 15 h dans le service de Toxicologie Clinique (Pr. ROCHE, Pr. Ag. MOTIN) pour intoxication médicamenteuse probable. Elle présente un coma profond (P₅ R₃ D₂ V₁ selon la cotation de DECHAUME et JOUVET) avec abolition des réflexes cornéens et hypoventilation. On apprend rapidement par la famille que la malade aurait absorbé, dans la matinée, au cours d'un épisode dépressif, 20 comprimés de Natisédine (ND) (comprimés dosés à 100 mg de phényléthylbarbiturate de quinidine), soit 1,20 g de quinidine et 800 mg de phénobarbital.

Un lavage gastrique est réalisé, sous intubation, et une diurèse forcée, neutre, de 6 litres/ 24 heures (2,5 l de sérum glucosé à 10 % puis 500 ml de mannitol à 10 %, toutes les 12 h) est mise en oeuvre. Cette diurèse sera poursuivie pendant 48 heures.

Les divers bilans pratiqués entre 15 et 18 h donnent les résultats suivants :

- l'ionogramme sanguin est normal :

Hématocrite :	47 %	Urée :	0,26 g/ litre
Chlore :	103 mEq/litre	Protéines :	68 g/ litre
Réserve alcaline :	26 mEq/litre	Glycémie :	0,86 g/ litre
Sodium :	141 mEq/litre	Osmolarité :	295 mOsm/litre
Potassium :	3,4 mEq/litre		

- La recherche dans les urines (pH 5) de barbituriques, phénothiazines, salicylés, imipramine, méprobamate est négative.

La barbitémie est à 44 mg/litre et la quinidinémie à 5,6 mg/litre.

- Le fond d'oeil est normal (absence de spasme artériel) et l'électrocardiogramme ne présente aucune perturbation.

Les suites de cette intoxication seront simples, caractérisées par la récupération complète d'un état de conscience normal le 4ème jour. Notons cependant que la malade a fait le 3ème jour un clocher thermique à 38,5 - 39°, la N.F. montrant alors une leucocytose à 51 500 et une polynucléose à 91 %. Tout est rentré dans l'ordre sous antibiothérapie.

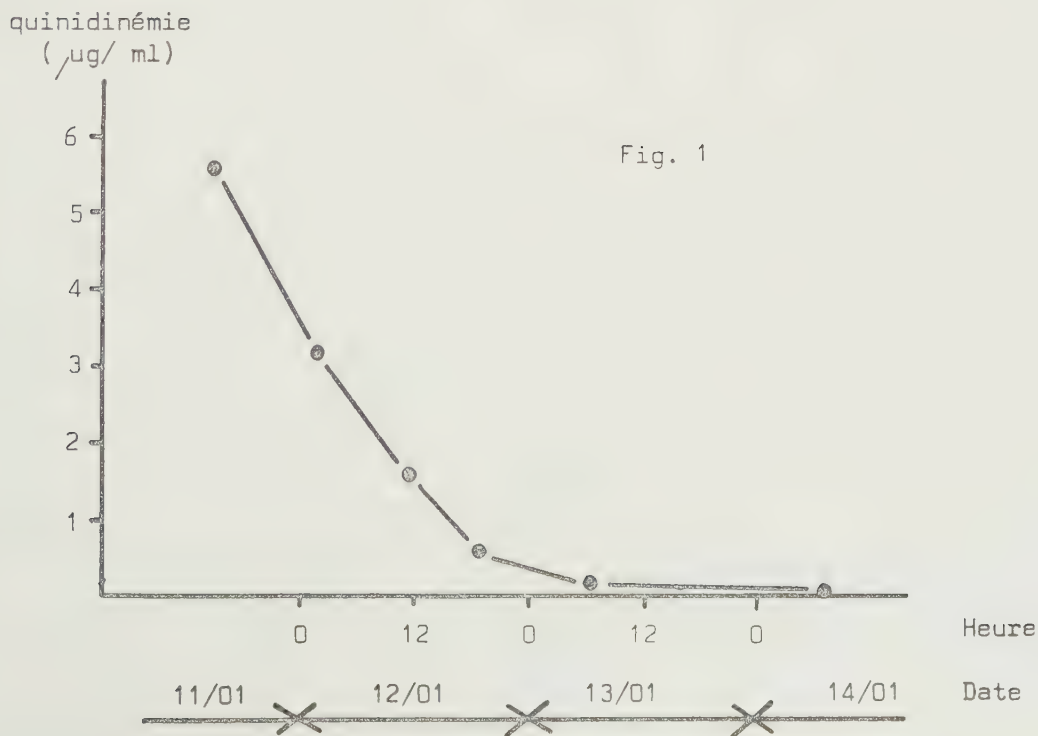
L'intérêt de cette observation réside moins dans son étude clinique que dans l'évolution du taux sanguin (tableau et figure 1), et dans l'élimination urinaire (tableau et figure 2) de la quinidine, que nous avons pu suivre très régulièrement.

Evolution de la quinidinémie

Tableau I

Date	Heure	Quinidinémie* µg/ ml
11/01/71	16 h	5,6
12/01/71	2 h	3,2
	12 h	1,65
	19 h	0,60
13/01/71	7 h	0,22
14/01/71	7 h	Inf. à 0,10

* les dosages ont été effectués sur sang total

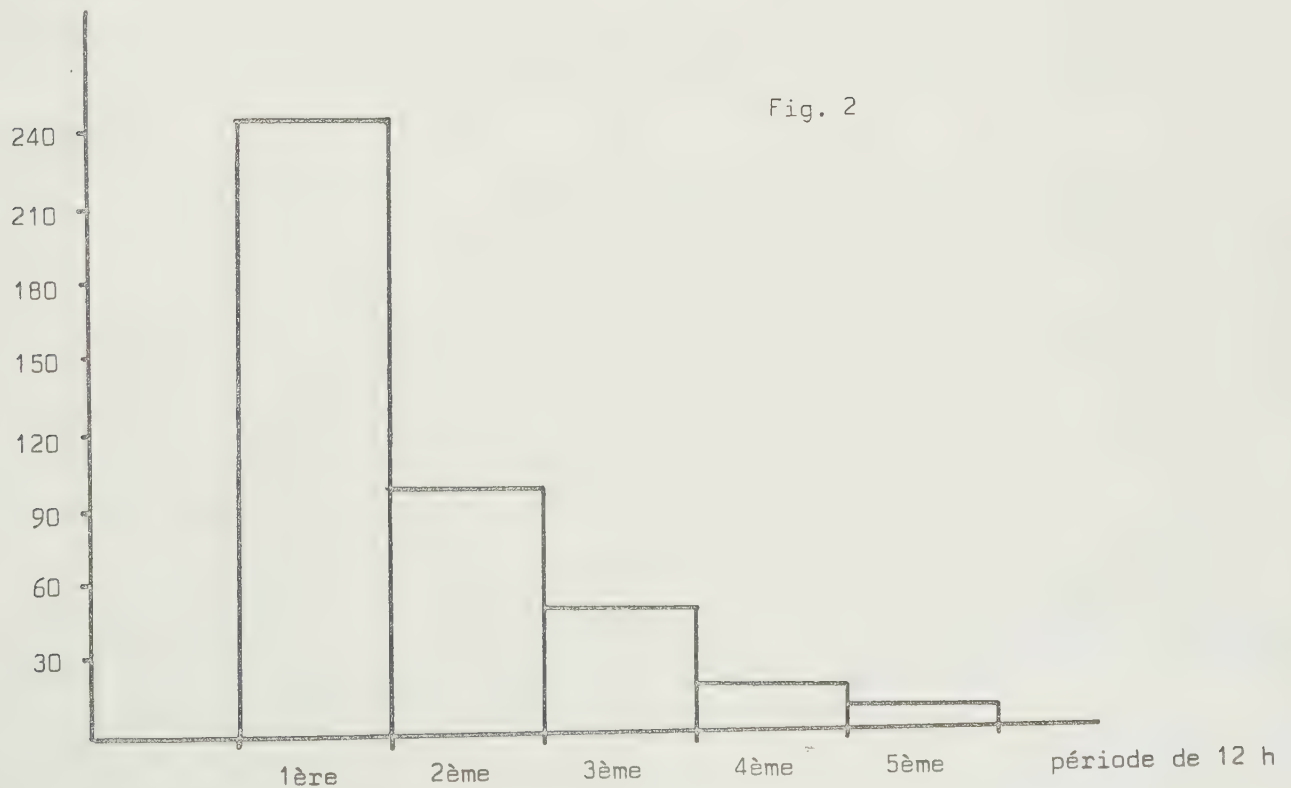


Excrétion urinaire fractionnée de la quinidine

Tableau II

		Elimination urinaire mg/litre	Diurèse ml	Elimination urinaire mg/ 12 h	Elimination urinaire cumulée (mg)
1 ^{re} période	de 19h 1 ^{er} 11 à 7h 1 ^{er} 12	162	1500	243	243
2 ^{ème} période	de 7h à 19h 1 ^{er} 12	25,8	3700	95	338
3 ^{ème} période	de 19h 1 ^{er} 12 à 7h 1 ^{er} 13	20,1	2250	45	383
4 ^{ème} période	de 7h à 19h 1 ^{er} 13	5,8	2450	14	397
5 ^{ème} période	de 19h 1 ^{er} 13 à 7h 1 ^{er} 14	6,3	1100	7	404

quinidine urinaire
(mg)



Cette intoxication mixte phénobarbital-quinidine eut une évolution favorable. Le barbiturique entraîna un coma de 3 jours (barbitémie initiale à 44 mg/litre) ; par contre, la quinidine ne fut responsable d'aucun trouble, le fond d'oeil et l'E.C.G. demeurant normaux. D'ailleurs, le taux de la quinidinémie à l'entrée - 5,6 mg/litre - correspondait à un taux thérapeutique, et il est admis que les signes toxiques apparaissent rarement lorsque la quinidinémie est inférieure à 7 mg/litre. Il faut remarquer la chute rapide de la quinidine sanguine. Cette décroissance est provoquée d'une part par la localisation tissulaire de cette substance, d'autre part par son élimination urinaire importante. En effet, nous avons retrouvé dans les urines 35 % de la dose présumée ingérée. Ce résultat a été obtenu grâce à une diurèse forcée neutre qui s'est avérée surtout utile pendant les premières 20 heures de l'intoxication, alors que les taux sanguins excédaient 1,5 mg/litre. D'ailleurs, pendant les 12 premières heures, la clearance rénale de la quinidine s'est élevée à 99 ml/mn. Aussi pensons-nous que dans les intoxications par la quinidine (et la quinine) où la quinidinémie peut atteindre 20 mg/litre et plus, une diurèse forcée neutre permet une élimination rénale accélérée du toxique. Cette diurèse doit être mise en oeuvre aussi précocement que possible, alors que les taux sanguins sont élevés. D'autre part, elle doit être neutre car, comme l'ont montré GERHARDT, KNOUSS et ZINN (122-124), l'alcalinisation des urines diminue très sensiblement la clearance de la quinidine :

pH urinaire* 6 - 7	Clearance = 53 ± 20 ml/mn
pH urinaire 7 - 8	Clearance = 26 ± 13 ml/mn

En outre, dans les intoxications sévères qui s'accompagnent de troubles de la conduction, l'administration I.V. de lactate de sodium molaire atténue rapidement les effets cardiotoxiques de la quinidine, comme l'ont montré les études expérimentales et cliniques de BELLET (125,126), WASSERMAN (127-129) et BAILEY (130). Seul LEE (131) se montre réservé quant à l'efficacité du lactate.

Les effets du THAM ont été également vantés, par SIERRA (132) et BERMUDEZ (133), pour réduire les troubles cardiaques de l'intoxication quinidinique. Mais ce composé ne risque-t-il pas, en provoquant une alcalinisation trop importante, d'atténuer grandement l'élimination urinaire du toxique.

Enfin, d'autres traitements ont été proposés, tels l'association angio-tensine-E D T A calcique (134), l'isoprotérénol (135,136)..., mais leur efficacité n'est pas établie dans l'intoxication quinidinique aiguë.

CONCLUSIONS

Dans le cadre de recherches portant sur l'analyse et le métabolisme de médicaments cardiotropes, nous avons étudié la quinidine.

Nous avons tout d'abord soumis plusieurs échantillons de quinidine d'origine différente, à l'analyse chromatographique, pour un contrôle de pureté. Aucun échantillon n'est chromatographiquement pur. Nous avons retenu pour notre étude, la quinidine la moins souillée. Elle renferme environ 5 % d'hydroquinidine. Néanmoins, elle se prête parfaitement à une étude de métabolisme.

Ensuite, nous proposons une technique spectrofluorimétrique de dosage de la quinidine dans les milieux biologiques. Chaque étape de cette technique est étudiée et trouve une justification expérimentale. L'emploi de la chromatographie en couches minces nous a permis en particulier de montrer que le benzène est le solvant d'extraction le plus approprié pour le dosage de la quinidine dans les milieux biologiques. Il extrait peu de métabolites dont on peut d'ailleurs se débarrasser par lavage alcalin de la phase organique extractive. La méthode proposée est rapide ; elle se prête aux séries importantes et possède les critères qui font la valeur d'une méthode de dosage : sensibilité, reproductibilité, spécificité.

Enfin, nous avons envisagé le sort de la quinidine dans l'organisme, chez le Chien. Cette étude se situe à trois niveaux :

- pharmacocinétique sanguine et tissulaire de la quinidine. Les taux sanguins de quinidine chutent rapidement, ce qui s'explique par la diffusion de la substance à la totalité du secteur extracellulaire et par son stockage intracellulaire. Les tissus parmi lesquels le tissu myocardique, sont capables de soustraire au secteur extracellulaire d'importantes quantités de quinidine, en raison d'une affinité qui est vive le plus fréquemment. L'importance de cette fixation

est conditionnée par l'abondance de l'irrigation mais aussi par le niveau de l'activité métabolique du tissu en question.

D'autre part, nous montrons que le rapport entre les concentrations auriculaires et plasmatiques varient très largement en fonction de plusieurs facteurs. Il est donc hasardeux de vouloir évaluer l'intensité de l'effet exercé d'après la quinidinémie.

- liaison de la quinidine aux protéines sériques.

L'électrophorèse sur papier et la chromatographie sur gel de Sephadex nous ont permis d'objectiver une liaison entre les protéines sériques du chien et la quinidine : 10 à 20 % au moins de quinidine sont liés. Il n'est pas exclu que le degré de liaison soit plus élevé, car il est probable que cette liaison, labile, "souffre" au cours des différents protocoles analytiques.

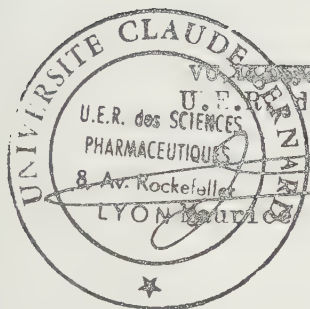
Quoiqu'il en soit, l'interaction protéine-quinidine modifie certainement peu les propriétés pharmacologiques et le métabolisme de la quinidine. Elle ne peut être un obstacle au passage du principe actif du sang dans les tissus et ne doit pas entraver son excrétion urinaire.

- métabolites urinaires de la quinidine.

L'utilisation des propriétés adsorbantes des Sephadex G-10 permet d'isoler 9 métabolites de la quinidine dans l'urine de chiens intoxiqués par cet alcaloïde. L'un de ceux-ci se trouve partiellement conjugué. L'identification de la structure de ces métabolites est en cours.

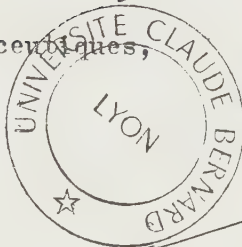
Ce protocole d'isolement est original. C'est en effet la première fois que les propriétés adsorbantes des Sephadex sont employées dans le but d'isoler de l'urine des médicaments et leurs métabolites.

Pour terminer, nous avons placé une intoxication aiguë volontaire par la quinidine, dont l'évolution fut favorable. Des dosages sanguins ont mis en évidence une chute rapide de la quinidinémie, chute due en partie à une élimination urinaire rapide : 35 % de la dose présumée ingérée ont été retrouvés dans les urines et la clearance rénale de la quinidine s'est élevée à 99 ml/mn .



~~VU et approuvé~~ Le Directeur,
U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques,

~~Le Directeur~~ CARRAZ



Le Président de la Thèse

VU et permis d'imprimer

LYON, le 20 mars 1972

Le Président de l'Université

~~Le Recteur, Président de~~ CLAUDE BERNARD,
~~Conseil de l'Université~~

J. BOLDIN

BIBLIOGRAPHIE

- 1 DE SENAC J.J. - Traité de la structure du coeur, de son action et de ses mala-
dies. Chez J. VINCENT, Paris, 1749, 2, p. 526 .
- 2 FREY W. - Weitere Erfahrungen mit Chinidin bei alsoluter Herzunregelmassigkeit.
Berl. Klin. Wochenschrift, 1918, 55, 849.
- 3 LENEGRE J., LABBE B., GAY J. - Les risques et accidents des traitements de l'a-
rythmie par fibrillation auriculaire. in Les Maladies thérapeutiques.
Masson éditeurs, Paris, 1971, pp. 57-95 (88 réf.) .
- 4 LOVE W.D. - The basis of quinidine therapy. Amer. J. Med. Sci., 1955, 229,
89-102 (146 réf.) .
- 5 CONN H.L., LUCHI R.J. - Cellular basis for regulation of the circulation by
digitalis and quinidine. Circ. Res., 1964, 14-15 : suppl. II, 153-168.
- 6 CONN H.L. - Quinidine as an antiarrhythmic agent. Basic and clinic considerations
Advanc. Cardiop. Dis., 1964, 2, 286-304 .
- 7 KAY C.F. - Quinidine - A reevaluation. Med. Clin. N. Amer., 1966, 50, 1221-1230.
- 8 DI MATTEO J., DELVAUX J.C. - La quinidine. Ann. Cardiol. Angéiol., 1970, 19,
344-351 .
- 9 LUSSMAN D.J., KIRCH E.R., WEBSTER G.L. - The separation of some of the cinchona
alkaloids by paper partition chromatography. J. Amer. Pharm. Ass., 1951,
40, 368-370 .

- 10 MOERLOOSE P. - Papierchromatographie van kinaalcaloïden. Pharm. Tijdschr. Belg., 1952, 29, 117-121 .
- 11 MOERLOOSE P. - Studie met behulp van het koolstofs isotop C^{14} over de biosynthese van de kina-alkaloïden. Pharm. Weekblad, 1954, 89, 541-557 (31 réf.) .
- 12 MARGASINSKI Z., SZYMANSKA A., WASILEWSKA L. - Chromatografia alkaloidow na bibule. Acta Pol. Pharm., 1955, 12, 65-84 (35 réf.) .
- 13 REICHELT J. - Papierchromatographie der Alkaloide. II. Identifizierung einiger Alkaloide in pharmazeutischen Präparaten. Pharmazie, 1956, 11, 718-724 (54 réf.) .
- 14 ADAMANIS F., MALEJKA D. - Paper Chromatographic determination of quinine and cinchonine. Bull. Soc. Amis Sciences Lettres (Poznan), 1960, 10, 77-93 (33 réf.) .
- 15 SYPER L. - A new chromatographic method of separating the alkaloids of cinchona bark. Dissert. Pharm., 1963, 15, 411-417 .
- 16 WALDI D., SCHNACKERZ K., MUNTER F. - Eine systematische Analyse von Alkaloiden auf Dunnschichtplatten. J. Chromatog., 1961, 6, 61-73 .
- 17 PARIS R.R., PARIS M. - Chromatographie en couche mince des alcaloïdes et des pigments anthocyaniques. Bull. Soc. Chim. France, 1963, 5, 1597-1599 .
- 18 NOIRFALISE A., MEES G. - Chromatographie sur couche mince de quelques alcaloïdes et bases aminées. J. Chromatog., 1967, 31, 594-597 .

- 19 DROST R.H., REITH J.F. - Identificatie van stoffen in de toxicologische analyse met behulp van het extractiesysteem van feldstein, dunnelaagchromatografie in U.V. spectrofotometrie. I. Basische stoffen. Pharm. Weekblad, 1967, 102, 1379-1387 .
- 20 TRUHAUT R., BOUDENE C., CLAUDE J.R. - Aperçus sur les applications de la chromatographie en couche mince en analyse toxicologique. Ann. Biol. Clin., 1968, 26, 93-111 .
- 21 VAN SEVEREN R. - L'identification des alcaloïdes du quinquina par la méthode de chromatographie en couches minces. J. Pharm. Belg., 1962, 17, 40-46 .
- 22 SUSZKO-PURZYCKA A., TRZEBNY W. - Thin-layer chromatography of cinchona alkaloids. I. Separation and identification of vinyl-bases and their dihydro-derivatives. J. Chromatog., 1964, 16, 239-242 .
- 23 STORCK J., PAPIN J.P., PLAS D. - Contribution à l'étude analytique des alcaloïdes du quinquina. Méthodes et applications. Ann. Pharm. Franç., 1970, 28, 25-37 .
- 24 PRUDHOMME R.O. - Nouvelle méthode colorimétrique de dosage de la quinine dans les liquides biologiques et les organes. J. Pharm. Chim., 1940, 132, 8 .
- 25 BRODIE B.B., UDENFRIEND S. - The estimation of basic organic compounds and a technique for the appraisal of specificity. Application to the cinchona alkaloids. J. Biol. Chem., 1945, 158, 705-714 .
- 26 BRODIE B.B., UDENFRIEND S., DILL W. - The estimation of basic organic compounds in biological material. V. Estimation by salt formation with methylorange. J. Biol. Chem., 1947, 168, 335-339 .

- 27 HASSELMANN M. - Le microdosage de la quinidine. Etude des combinaisons formées entre la quinidine et quelques dérivés dihydroxy-fluoranniques. Application au dosage de la quinidine dans l'urine et le sérum sanguin. Thèse Méd. STRASBOURG, 1957.
- 28 KELSEY F.E., GEILING E.M.K. - The micro determination of quinine in blood and tissues. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1942, 75, 183-186 .
- 29 EDGAR A.L., SOKOLOW M. - Experiences with the photofluorometric determination of quinidine in blood. J. Lab. Clin. Med., 1950, 36, 478-484 .
- 30 BRODIE B.B., UDENFRIEND S., BAER J.E. - The estimation of basic organic compounds in biological materials. I. General principles. J. Biol. Chem., 1947, 168, 299-309 .
- 31 BRODIE B.B., UDENFRIEND S., DILL W., DOWNING G. - The estimation of basic organic compounds in biological material. II. Estimation of fluorescent compounds. J. Biol. Chem., 1947, 168, 311-318 .
- 32 UDENFRIEND S. - Fluorescence assay in biology and medicine. Academic Press, New-York, 1962, pp. 401-403 .
- 33 CRAMER G., ISAKSSON B. - Quantitative determination of quinidine in plasma. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1963, 15, 553-556 .
- 34 BRODIE B.B., UDENFRIEND S. - The estimation of quinine in human plasma with a note on the estimation of quinidine. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1943, 78, 154-158 .
- 35 ARCHER H.E., WEITZMAN D., KAY H.L. - Control of quinidine dosage. Brit. Heart J., 1955, 17, 534-540 .

- 36 GELFMAN N., SELIGSON D. - Quinidine. Amer. J. Clin. Path., 1961, 36, 390-392.
- 37 BALATRE P.H., LEFEVRE Cl., MERLEN J.F. - Dosage fluorescimétrique de la quinine et de la quinine dans le sérum sanguin et dans les urines. Ann. Biol. Clin., 1960, 18, 228-230 .
- 38 HAMFELT A., MALERS E. - Determination of quinidine concentration in serum in the control of quinidine therapy. Acta Soc. Med. Upsal., 1963, 68, 181-191.
- 39 HARTEL G., HARJANNE A. - Comparison of two methods for quinidine determination and chromatographic analysis of the difference. Clin. Chim. Acta, 1969, 23, 289-294 .
- 40 JOSEPHSON E.S., UDENFRIEND S., BRODIE B.B. - The estimation of basic organic compounds in biological material. VI. Estimation by ultraviolet spectrophotometry. J. Biol. Chem., 1947, 168, 341-344 .
- 41 KAYE S. - Handbook of emergency toxicology. Thomas éditeur, Springfield, 1961, pp. 48-58 .
- 42 MERVILLE R., DEQUIDT J. - Contribution au dosage polarographique de la quinine dans les liquides biologiques. Bull. Soc. Pharm. Lille, 1953, 2, 35-37.
- 43 BIRD L.H. - A note on the adsorption of quinine from fluorimetric standard solutions. N. Z. J. Sci. Technol., 1949, 303, 334-335 .
- 44 HARTEL G., KORHONEN A. - Thin layer chromatography for the quantitative separation of quinidine and quinidine metabolites from biologic fluids and tissues. J. Chromatog., 1968, 37, 70-75 .

- 45 SUSZKO-PURZYCKA A., TRZEBNY W. - Thin-layer chromatography of cinchona alkaloids. II. Qualitative examination of dihydrobases of the cinchona alkaloids in commercial products. J. Chromatog., 1965, 17, 114-119 .
- 46 DELEVETT A.F., POINDEXTER C.A. - Plasma concentrations of quinidine with particular reference to therapeutically effective levels in two cases of paroxysmal nodal tachycardia. Amer. Heart J., 1946, 32, 697-703 .
- 47 LINENTHAL A.J., ULICK S., PATTERSON L.A. - Fluorometric measurement of plasma quinidine and its correlation with cardiac effects in man. J. Clin. Invest., 1947, 26, 1188 .
- 48 TAGGART J.V., EARLE D.P., BERLINER R.W., ZUBROD C.G., ... - Studies on the chemotherapy of the human malaras. III. The physiological disposition and antimalarial activity of the cinchona alkaloids. J. Clin. Invest., 1948, 27, 80-86 .
- 49 HOUSTON A.B., PERRY W.F. - The plasma concentration of quinidine after oral administration and its effect on auricular fibrillation. Canad. Med. Ass. J., 1950, 63, 56-60 .
- 50 MANKIN J.W. - The effect of gastric acidity on the absorption of quinidine sulfate from the gastrointestinal tract. J. Lab. Clin. Med., 1953, 41, 929-930.
- 51 KALMANSÖHN R.W., SAMPSON J.J. - Studies of plasma quinidine content. I. Relation to single administration by three routes. Circulation, 1950, 1, 564-568.
- 52 LINDSETH-DITLEFSEN E.M. - Concentrations of quinidine in blood following oral, parenteral and rectal administration. Acta Med. Scand., 1953, 146, 81-92 .

- 53 BROWN M.G., HOLZMAN D., CREELMAN E.W. - Serum quinidine concentration in congestive heart failure. Amer. J. Med. Sci., 1953, 225, 129-131 .
- 54 BARBIER J.B. - Contribution à l'étude de la réduction quinidinique des fibrillations auriculaires. A propos de 65 observations comportant des dosages de la quinidinémie. Thèse Méd. LYON, 1958 .
- 55 SOKOLOW M., EDGAR A.L. - Blood quinidine concentrations as a guide in the treatment of cardiac arrhythmias. Circulation, 1950, 1, 576-592 .
- 56 MOUQUIN M., HATT P., PY J., PY-JACQUEMIN A., GARDENT J. - Détermination de la quinidinémie au cours des tentatives de réduction de la fibrillation auriculaire ou du flutter par la quinidine. Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris, 1957, 73, 724-737 .
- 57 VAN DE WIEL Th.W.M. - De dosering van kinidine en de kinidinespiegel in het serum. Ned. T. Geneesk., 1959, 103, 2547-2554 .
- 58 SWISHER W.P., WEDELL H.G., CHENG J.T.O., SUTTON G.C., SUTTON D.C. - Studies of quinidine plasma levels and rate of decline following cessation of quinidine administration. Amer. Heart J., 1954, 47, 449-452 .
- 59 LINDSETH-DITLEFSEN E.M. - Quinidine concentration in blood and excretion in urine following parenteral administration as related to congestive heart failure. Acta Med. Scand., 1957, 159, 105-109 .
- 60 MICHEL D., NICKEL H. - Chinidinblutspiegel und Chinidinausscheidung bei jungen und alten Menschen. Z. Alternsforsch., 1965, 18, 267-273 .
- 61 WEGRIA R., BOYLE M.N. - Correlation between the effect of quinidine sulfate on the heart and its concentration in the blood plasma. Amer. J. Med., 1948, 4, 373-382 .

- 62 WEISMAN S.A. - Review and evaluation of quinidine therapy for auricular fibrillation. J. A. M. A., 1953, 152, 496-499 .
- 63 SOKOLOW M., BALL R.E. - Factors influencing conversion of chronic atrial fibrillation with special reference to serum quinidine concentration. Circulation, 1956, 14, 568-583 .
- 64 CONN H.L., LUCHI R.J. - Some cellular and metabolic considerations relating to the action of quinidine as a prototype antiarrhythmic agent. Amer. J. Med., 1964, 37, 685-699 .
- 65 LINDSETH-DITLEFSEN E.M. - Concentration of quinidine in blood following delayed absorption tablets. Acta Med. Scand., 1954, 149, 49-53 .
- 66 SHAFTEL N., HALPERN A. - The clinical study of quinidine polygalacturonate. Amer. J. Med. Sci., 1958, 236, 184-203 .
- 67 RICHARDSON D.W., ZEE M.E., WYSO E.M. - Maintenance quinidine therapy value of enteric-coated quinidine tablets. Amer. J. Cardiol., 1960, 5, 417-420.
- 68 CULLHED I., HAMFELT A., MALERS E. - Serum quinidine concentration with two long-acting quinidine preparations. Acta Med. Scand., 1966, 179, 333-336 .
- 69 TRICOT R., NOGRETTE P. - L'arabogalactane sulfate de quinidine. Utilisation en thérapeutique. Gaz. Méd. France, 1971, 78, 1396-1401 .
- 70 WAREMBOURG H., DUCLOUX G. - Un nouvel anti-arythmique : un dérivé quinidinique à action prolongée. Lille Méd., 1971, 16, suppl. 1, 234-237 .

- 71 HIATT E.P., QUINN G.P. - The distribution of quinine, quinidine, cinchonine and cinchonidine in fluids and tissues of dogs. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1945, 83, 101-105 .
- 72 KELSEY F.E., OLDHAM F.K., GEILING E.M.K. - Studies on antimalarial drugs. The metabolism of quinine and quinidine in birds and mammals. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1945, 85, 170-175 .
- 73 ARORA R.B., SHARMA J.N., TARAK T.K., SAXENA Y.R. - Intracellular localization of quinidine. Biochem. Pharmacol., 1965, 14, 1491-1498 .
- 74 DUTTA P., ARORA R.B., CHAUHAN P.S. - Subcellular distribution of quinidine in rat heart. Ind. J. Med. Res., 1968, 56, 1712-1719 .
- 75 EVREUX J.Cl., MAGNIEN J.M., DEMIAUX J.P., FAUCON G., BADINAND A. - Evolution des taux d'imipramine dans divers organes après une injection veineuse. C. R. Soc. Biol., 1968, 162, 1529-1533 .
- 76 FAUCON G., ROUZIOUX J.M., ARMAND J., EVREUX J.Cl., BADINAND A. - Fixation tissulaire médicamenteuse et activité métabolique. Thérapie, sous presse .
- 77 EVREUX J.Cl., ARMAND J., BAZAUGOUR R., BADINAND A., FAUCON G. - Action pharmacologique ou toxique et teneur cellulaire. J. Pharmacol., sous presse .
- 78 GOLDSTEIN A. - The interactions of drugs and plasma proteins. Pharmacol. Rev., 1949, 1, 102-165 (280 réf.) .
- 79 MEUNIER M.T. - Contribution à l'étude de la liaison de quelques médicaments aux protéines sériques. Thèse Doct. Univ. Pharm., Clermont-Ferrand, 1961 (285 réf.) .

- 80 COHEN Y., WEPIERRE J., ROUSSELET J.P. - Les radioéléments dans l'étude des phénomènes de transport par les protéines plasmatiques. Ann. Biol. Clin., 1967, 25, 81-106 (56 réf.) .
- 81 GLASSON B. - Influence de la liaison protéinique des médicaments sur leur métabolisme. Actualités Pharmacol., 1970, 23, 109-133 (66 réf.) .
- 82 MEYER M.C., GUTTMAN D.E. - The binding of drugs by plasma proteins. J. Pharm. Sci., 1968, 57, 895-918 (595 réf.) .
- 83 CONN H.L., LUCHI R.J. - Some quantitative aspects of the binding of quinidine and related quinoline compounds by human serum albumin. J. Clin. Invest., 1961, 40, 509-516 .
- 84 CONN H.L., LUCHI R.J. - Ionic influences on quinidine-albumin interaction. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1961, 133, 76-83 .
- 85 DETERMANN H. - Chromatographie sur gel. Masson et Cie, Editeurs. Paris 1969 .
- 86 DAUGHADAY W.H., LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FIELDS W.S. - Determination of cerebrospinal fluid protein with the Folin phenol reagent. J. Lab. Clin. Med., 1952, 39, 663-665 .
- 87 BARLOW C.F., FIREMARK H., ROTH L.J. - Drug-plasma binding measured by Sephadex. J. Pharm. Pharmacol., 1962, 14, 550-555 .
- 88 NAIR V., FINER S. - Studies on the binding of drugs to plasma proteins. Fed. Proc., 1964, 23, 282 .
- 89 POTTER G.D., GUY J.L. - A micromethod for analysis of plasma salicylate. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1964, 116, 658-660 .

- 90 STROMME H. - Interactions of disulfiram and diethyldithiocarbamate with serum proteins studied by means of a gel-filtration technique. Biochem. Pharmacol., 1965, 14, 381-391 .
- 91 STURMAN J.A., SMITH M.J.H. - The binding of salicylate to plasma proteins in different species. J. Pharm. Pharmacol., 1967, 19, 621-623 .
- 92 LEE K.H., THOMPCKINS L. - Separation of acetylsalicylic acid and salicylic acid by Sephadex gel filtration. Fed. Proc., 1968, 27, 237 .
- 93 LEE K.H., THOMPCKINS L., SPENCER M.R. - Separation of acetyl-salicylic acid and salicylic acid by Sephadex gel filtration. J. Pharm. Sci., 1968, 57, 1240-1242 .
- 94 KRIEGLSTEIN V.J., KUSCHINSKY G. - Quantitative Bestimmung der Eiwei binding von Pharmaka durch Gelfiltration. Arzneim. Forsch., 1968, 18, 287-289 .
- 95 WOOD G.C., COOPER P.F. - The application of gel filtration to the study of protein-binding of small molecules. Chromatog. Rev., 1970, 12, 88-107 (174 réf.) .
- 96 RODIER J., MALLEIN R. - Manuel de Biochimie pratique. 2ème édition. Maloine Editeurs. Paris, 1961. p. 180 .
- 97 RABE P. - Zur Kenntnis der China-Alkaloide. XXIII. Zur Nomenklatur und über Isomerie-Erscheinungen. Ber. Deutsch. Chem. Gessel., 1922, 55, 522-532.
- 98 MEAD J., KOEPFLI J.B. - The structure of a new metabolic derivative of quinine. J. Biol. Chem., 1944, 154, 507-515 .

- 99 KELSEY F.E., GEILING E.M.K., OLDHAM F.K., DEARBORN E.H. - Studies on antimalarial drugs. The preparation and properties of a metabolic derivative of quinine. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1944, 80, 391-392 .
- 100 BRODIE B.B., BAER J.E., CRAIG L.C. - Cinchona alkaloids : 4. Metabolic products in human urine. Fed. Proc., 1946, 5, 168 .
- 101 BRODIE B.B., BAER J.E., CRAIG L.C. - Metabolic products of the cinchona alkaloids in human urine. J. Biol. Chem., 1951, 188, 567-581 .
- 102 FRASER G.P., KERMACK W.O. - Action of sheep liver homogenates on quinine, quinidine, cinchonine and cinchonidine. Biochem. J., 1952, 52, XXVI-XXVII .
- 103 PALMER K.H., MARTIN B., BAGGETT B., WALL M.E. - The metabolite fate of orally administered quinidine gluconate in humans. Biochem. Pharmacol., 1969, 18, 1845-1860 .
- 104 VALLON J.J., BADINAND A., BICHON C. - Isolement chromatographique sur sephadex G-10 des métanéphrines et des mélanogènes des urines. Clin. Chim. Acta, 1972, 36, 397-404 .
- 105 GELOTTE B. - Studies on gel filtration. Sorption properties of the bed material sephadex. J. Chromatog., 1960, 3, 330-342 .
- 106 CONTRACTOR S.F., JOMAIN P. - The use of Sephadex G-10 in the removal of inorganic salts and urea from rat and human urine prior to chromatography of 5-hydroxyindole metabolites. Clin. Chim. Acta, 1966, 14, 535-539 .
- 107 WOOF J.B., PIERCE J.S. - Separation of complex mixtures of poly-hydroxyphenols on columns of Sephadex. J. Chromatog., 1967, 28, 94-103 .

- 108 BLASI F., MASI R.V. - Adsorption properties of iodotyrosines and derivatives on Sephadex. J. Chromatog., 1967, 28, 33-36 .
- 109 SWEETMAN L., NYHAN W.L. - Sephadex G-10 adsorption chromatography of purines and related compounds. J. Chromatog., 1968, 32, 662-675 .
- 110 SWEETMAN L., NYHAN W.L. - Studies on the mechanism of adsorption of purines in Sephadex G-10 chromatography. J. Chromatog., 1971, 59, 349-366 .
- 111 DEMETRIOU J.A., MACIAS F.M., Mc ARTHUR M.J., BEATTIE J.M. - Gel filtration chromatography of fluorescent phenolic and heterocyclic compounds. J. Chromatog., 1968, 34, 342-350 .
- 112 NIYOGI S.K., TOMPSETT S.L., STEWART C.P. - The use of a cation exchange resin in the separation of some alkaloids from animal tissue extracts. Clin. Chim. Acta, 1961, 6, 739-741 .
- 113 DOLE V.P., KIM W.K., EGLITIS I. - Detection of narcotic drugs, tranquilizers, amphetamines, and barbiturates in urine. J. A. M. A., 1966, 198, 349-352 .
- 114 BASELT R.C., CASARETT L.J. - Detection of drugs in urine for methadone treatment programs. J. Chromatog., 1971, 57, 139-141 .
- 115 HETLAND L.B., KNOWLTON D.A., COURI D. - A method for the detection of drugs at therapeutic dosages in human urine using adsorption column chromatography and thin-layer chromatography. Clin. Chim. Acta, 1972, 36, 473-478.
- 116 FAIVRE G., WEILLER M., PETITIER H., DODINOT B., POLU J.M. - A propos d'un cas d'intoxication quinidinique mortelle. Ann. Méd. Nancy, 1968, 7, 924-930 .

- 117 ALBANO A., GAITA D., LUCHETTI L., MARINOSCI A., MICOLI A. - Rilievi elettrocardiografici in corso di intossicazione acuta da solfato di chinidina. Clin. Terap., 1969, 48, 485-490 .
- 118 KERR F., KENDYER G., BILITCH M. - Quinidine overdose. Neurological and cardiovascular toxicity in a normal person. Brit. Heart J., 1971, 33, 629-631 .
- 119 WARFINGE L.E. - Acute quinidine poisoning in a 3 year old child. Acta Paed., 1950, 39 : suppl. 78-79, 262-264 .
- 120 SPERA F. - Su un caso di avvelenamento mortale con chinidina avvenuta in un bambino. Clin. Pediat., 1965, 47, 581-587 .
- 121 EVREUX J.Cl., MOTIN J., ROCHE L., VINCENT V. - Précis de Toxicologie Clinique. Masson Ed., Paris (1968) p. 110 .
- 122 KNOUSS R.F., GERHARDT R.E., THYRUM P.T., LUCHI R.J., MORRIS J.J. - Variation in quinidine excretion with changing urine pH. Ann. Intern. Med., 1968, 68, 1157 .
- 123 GERHARDT R.E., KNOUSS R.F., THYRUM P.T., LUCHI R.J., MORRIS J.J. - Quinidine excretion in aciduria and alkaluria. Ann. Intern. Med., 1969, 71, 927-933 .
- 124 ZINN M.B. - Quinidine intoxication from alkali ingestion. Texas Med., 1970, 66, 64-66 .
- 125 BELLET S., HAMDEN G., SOMLYO A. - Reversal of the cardiotoxic effects of quinidine by molar sodium lactate. Clin. Res., 1958, 6, 226 .

- 126 BELLET S., HAMDAN G., SOMLYO A., LARA R. - The reversal of cardiotoxic effects of quinidine by molar sodium lactate : an experimental study. Am. J. Med. Sci., 1959, 237, 165-176 .
- 127 WASSERMAN F., BRODSKY L., KATHE J.H., RODENSKY P.L., DICK M.M., DENTON P.S. - A method for the treatment of quinidine and procaine amide intoxication : a clinical and experimental study. Clin. Res., 1958, 6, 227 .
- 128 WASSERMAN F., BRODSKY L., DICK M.M., KATHE J.H., RODENSKY P.L. - Successful treatment of quinidine and procaine amide intoxication. Report of three cases New Engl. J. Med., 1958, 259, 797-802 .
- 129 WASSERMAN F., BRODSKY L., KATHE J.H., RODENSKY P.L., DICK M.M., DENTON P.S. - The effect of molar sodium lactate in quinidine intoxication. An experimental study. Amer. J. Cardiol., 1959, 3, 294-299 .
- 130 BAILEY D.J. - Cardiotoxic effects of quinidine and their treatment. Review and case reports. Arch. Int. Med., 1965, 105, 37-46 .
- 131 LEE Y.C. - Quinidine intoxication : an experimental study of the effect of molar sodium lactate and potassium chloride. Am. Heart J., 1960, 60, 785-798.
- 132 SIERRA M.A., KEYES M.H., WILLIAMS R.M., BECKER D.J., SILVERBLATT C.W., GARDNER W.R. WASSERMAN F. - The effect of THAM in experimental quinidine intoxication. Am. J. Cardiol., 1962, 10, 562-569 .
- 133 BERMUDEZ G.A. - The role of potassium in experimental quinidine intoxication, and its treatment with THAM. H.F. Hosp. Med. Bull., 1965, 13, 331-355.

- 134 LUCHI R.J., HELWIG J., CONN H.L. - Quinidine toxicity and its treatment. An experimental study. Am. Heart J., 1963, 65, 340-348 .
- 135 NICKEL S.N., THIBAUDEAU Y. - Quinidine intoxication treated by isoproterenol. Canad. Med. Ass. J., 1961, 85, 81-83 .
- 136 GOTTSEGEN G., OSTOR E. - Prevention of the cardiotoxic effect of quinidine by isoproterenol. Am. Heart J., 1963, 65, 102-109 .

T A B L E D E S M A T I E R E S

INTRODUCTION	2
CHAPITRE PREMIER - ETUDE ANALYTIQUE PAR CCM DE QUELQUES ALCALOIDES DU QUINQUINA	
PURETE DE LA QUINIDINE DU COMMERCE	6
1. Travaux antérieurs	7
2. Travaux personnels	8
3. Conclusion	12
CHAPITRE SECOND - DOSAGE DE LA QUINIDINE (OU QUININE) DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES	14
1. Travaux antérieurs	16
1.1. Méthodes colorimétriques	16
1.2. Méthodes physiques	17
1.2.1. Spectrofluorimétriques	17
1.2.2. Spectrographiques	19
1.2.3. Polarographiques	21
1.3. Conclusion	21
2. Travaux personnels	22
2.1. Technique de dosage proposée	22
2.2. Etude et justification expérimentale de la méthode proposée	26
2.3. Contrôle chromatographique de la méthode - Utilisation d'autres solvants d'extraction que le benzène - Résultats	33
3. Conclusion	38

CHAPITRE TROISIEME - SORT DE LA QUINIDINE DANS L'ORGANISME - ETUDE CHEZ LE CHIEN ..	40
A. DISTRIBUTION SANGUINE ET TISSULAIRE DE LA QUINIDINE	44
1. Travaux antérieurs	44
1.1. Absorption et formes circulantes de la quinidine	44
1.2. Taux sanguins après administration de quinidine	45
1.3. Elimination urinaire de la quinidine	47
1.4. Intérêt de la détermination de la quinidinémie	47
1.5. Distribution tissulaire de la quinidine	49
2. Travaux personnels	51
2.1. Evolution sanguine et tissulaire des taux de quinidine, chez le Chien, après une injection veineuse de 10 mg/kg de poids	52
2.1.1. Technique	52
2.1.2. Résultats	52
2.1.2.1. Evolution des taux sanguins	52
2.1.2.2. Répartition tissulaire	58
2.1.2.3. Cinétique de la fixation tissulaire	61
2.2. Evolution sanguine et tissulaire des taux de quinidine, chez le Chien, après injection veineuse de 50 mg/kg de poids	70
2.2.1. Technique	70
2.2.2. Résultats	70
2.2.2.1. Evolution des taux sanguins	70
2.2.2.2. Répartition tissulaire	71
2.2.2.3. Cinétique de la fixation tissulaire	72
2.3. Discussion	89
3. Conclusion	92
B. LIAISON DE LA QUINIDINE AUX PROTEINES SERIQUES DU CHIEN - ETUDE PAR FILTRA- TION SUR GEL ET PAR ELECTROPHORESE SUR PAPIER	93
1. Introduction	93
2. Travaux personnels	95

